

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA E
INMUNOGÉNICA DE LA PROTEÍNA F DEL
METAPNEUMOVIRUS HUMANO Y DE
PROTEÍNAS QUIMÉRICAS CON LA
PROTEÍNA HOMÓLOGA DEL VIRUS
RESPIRATORIO SINCITIAL HUMANO**

TESIS DOCTORAL

EDUARDO OLMEDILLAS CELA

MADRID, 2017

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Clasificación del hMPV y del hRSV	1
2. Estructura del virión del hMPV	2
3. Organización génica	2
4. Ciclo replicativo del hMPV	4
5. Epidemiología	6
6. Variabilidad genética del hMPV	7
7. Patogénesis y diagnóstico	8
8. Respuesta inmune frente al hMPV	9
8.1. Barreras físicas e inmunidad innata	10
8.2. Inmunidad humoral	10
8.3. Inmunidad celular	11
9. Glicoproteína F	12
9.1. Proceso de fusión de membranas	14
9.2. Caracterización de las proteínas F pre- y post-fusión del hMPV	17
9.3. Estructura antigénica de la proteína F del hMPV	21
9.4. Inmunogenicidad de la proteína F del hMPV	22
10. Tratamiento y prevención	24
10.1. Antivirales	24
10.2. Inmunoprofilaxis con anticuerpos	25
10.3. Vacunas pediátricas	26
10.4. Vacunas quiméricas	27
II. OBJETIVOS	29
III. MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Material biológico	31
1.1. Líneas celulares	31
1.2. Virus	31
1.3. Bacterias y plásmidos	32
1.4. Animales	33
1.5. Anticuerpos	33
1.6. Oligonucleótidos	33
2. Medios de cultivo	35
2.1. Medios de células eucariotas	35
2.2. Medios para bacterias	36
3. Manipulación de células y virus	36
3.1. Cultivo de células eucariotas	36
3.2. Cultivo de bacterias	37
3.3. Metapneumovirus humano	37
3.3.1. Crecimiento y titulación de metapneumovirus humano (hMPV)-GFP	37

3.3.2. Ensayos de neutralización del hMPV-GFP	38
3.3.3. Obtención y caracterización de virus hMPV _{A1} -GFP resistentes a AcMs	38
3.4. Virus respiratorio sincitial humano	40
3.4.1. Crecimiento y titulación del virus respiratorio sincitial humano	40
3.4.2. Ensayos de neutralización del hRSV-GFP	41
3.5. Virus Vaccinia	41
3.5.1. Obtención de virus vaccinia recombinantes	41
3.5.2. Titulación de virus vaccinia por plaqueo en agar	43
4. Obtención y manejo de anticuerpos monoclonales (AcMs)	43
4.1. Obtención de hibridomas	43
4.2. Purificación de anticuerpos monoclonales (AcMs)	44
4.3. Marcaje de los AcMs con biotina	45
4.4. Obtención y purificación de fragmentos Fab	45
5. Mutagénesis de plásmidos pRB21 y expresión transitoria de proteínas F	46
5.1. Mutagénesis de los plásmidos pRB21	46
5.2. Transformación de bacterias competentes y selección de bacterias transformadas	47
5.3. Expresión transitoria en ensayos de infección-transfección con los plásmidos pRB21	47
6. Expresión y purificación de proteínas F	48
6.1. Cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC)	48
6.2. Cromatografía de filtración en gel	49
7. Técnicas inmunoquímicas	49
7.1. ELISAs	49
7.1.1. ELISA directo	49
7.1.2. ELISA de competición	50
7.1.3. ELISA indirecto (o de captura)	50
7.2. Surface plasmon resonance (SPR) (Biacore)	51
8. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (Western Blot)	51
9. Microscopia electrónica	52
10. Análisis estadístico	53
IV. RESULTADOS	55
1. Descripción general de los anticuerpos monoclonales (AcMs) obtenidos en este trabajo	55
2. Ensayos de competición de los AcMs por la unión simultánea a la glicoproteína F del hMPV	57
3. Reactividad de los AcMs en ensayos de “Western blot” con la proteína post-fusión hMPV F _{A1}	58
4. Caracterización de los anticuerpos monoclonales (AcMs) murinos agrupados por sitio antigénico	60
4.1. AcMs específicos del motivo 6-HB de la proteína F post-fusión del hMPV: MF1, MF2 y MF3	60
4.2. AcMs específicos del sitio antigénico II de la proteína F del hMPV: MF9, MF12, MF14 y MF15	63

4.2.1. Reactividad de los AcMs con la proteína F del hMPV y capacidad neutralizante	63
4.2.2. Virus resistentes a los AcM neutralizantes dirigidos frente a epítopos del sitio antigénico II del hMPV	65
4.2.3. Reactividad de los AcMs con mutantes simples en el sitio antigénico II de la proteína post-fusión hMPV F _{A1}	66
4.3. AcMs específicos del sitio antigénico IV de la proteína F del hMPV: MF11, MF16 y MF20	69
4.3.1. Reactividad de los AcMs con la proteína F del hMPV y capacidad neutralizante	69
4.3.2. Virus resistentes a los AcM neutralizantes dirigidos frente a epítopos del sitio antigénico IV del hMPV	70
4.3.3. Reactividad de los AcMs con mutantes simples del sitio antigénico IV de la proteína post-fusión hMPV F _{A1}	71
4.4. AcMs dirigidos frente a un sitio antigénico todavía no localizado en la proteína F del hMPV: MF17, MF18 y MF19	74
5. Expresión y caracterización de proteínas F quiméricas	76
5.1. Proteínas quiméricas F post-fusión del hMPV con el sitio antigénico II del hRSV	78
5.1.1. Expresión y caracterización de proteínas quiméricas F post-fusión del hMPV con el sitio antigénico II del hRSV	78
5.1.2. Inmunogenicidad de las proteínas F quiméricas F-415 y F-416	84
5.2. Proteínas quiméricas F pre-fusión del hRSV con el sitio antigénico IV del hMPV	87
5.2.1. Expresión y caracterización de proteínas quiméricas F pre-fusión del hRSV con el sitio antigénico IV del hMPV	87
5.2.2. Inmunogenicidad de las proteínas F quiméricas F-410 y F-411	92
V. DISCUSIÓN	95
1. Obtención de AcMs específicos de la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV	95
2. Obtención y caracterización de AcMs dirigidos frente a distintos sitios antigénicos de la proteína F del hMPV	96
3. Comparación de los sitios antigénicos de las proteínas F del hMPV y del hRSV	100
4. Proteínas de fusión quiméricas inducen una respuesta de anticuerpos cross-neutralizante y establecen una vía para el desarrollo de una vacuna universal frente a los pneumovirus	104
VI. CONCLUSIONES	109
VII. PUBLICACIONES	125
1. Publicaciones relacionadas con esta Tesis	125
2. Otras publicaciones	125

ABREVIATURAS

6-HB	De sus siglas en inglés “six hélix bundle”
Å	Amstrong
aa	Aminoácido
Ab	Antibiótico
Ac	Anticuerpo
ACE	3-Amino-9-etil-carbazol
AcM	Anticuerpo monoclonal
aMPV	Metapneumovirus aviar
BSA	Seroalbúmina bovina
cDNA	DNA complementario
cRNA	RNA complementario
CT	Cola citoplasmática
C-Terminal	Extremo carboxi-terminal
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen diamino tetracetato sódico
ELISA	De sus siglas en inglés “Enzyme linked inmunosorbent assay”
F	Proteína F
F/Tm ⁻	Proteína F que carece de la región transmembrana
Fab	Fragmento de unión al antígeno
FP	De sus siglas en inglés “Péptido de fusión”
GE	De sus siglas en inglés “Gene end”
GFP	De sus siglas en inglés “Green fluorescence proteín”
GS	De sus siglas en inglés “Gene start”
GST	Glutation S-transferasa

His	Histidinas
hMPV _{A1}	Metapneumovirus humano sulblinaje A1
hMPV _{A1} -GFP	Metapneumovirus humano sulblinaje A1 recombinante que expresa la proteína GFP
hMPV _{B1} -GFP	Metapneumovirus humano sulblinaje B1 recombinante que expresa la proteína GFP
hMPV _{A1}	Metapneumovirus humano sulblinaje A1
hMPV _{B1}	Metapneumovirus humano sulblinaje B1
HN	Hemaglutinina
HRA	Región heptádica A
HRB	Región heptádica B
hRSV	Virus respiratorio sincitial humano
hRSV-GFP	Virus respiratorio sincitial humano recombinante que expresa la proteína GFP
Ig	Inmunoglobulina
IMAC	Cromatografía de afinidad por intercambio de iones
IMDM	Medio Dulbecco modificado por Iscove
ITR	Infecciones del tracto respiratorio
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
M	Molaridad
mA	Miliamperios
ME	Microscopia electrónica
Mon	Monómero de la proteína F
mRNA	RNA mensajero
MWCO	De sus siglas en inglés "Molecular weight cut-off" (Peso molecular corte)
NK	De sus siglas en inglés "Natural killer"
Nm	Nanómetros
Nt	Nucleótidos
N-terminal	Extremo amino-terminal
O.D.	Densidad óptica

OPD	O-fenilendiamina
ORF	De sus siglas en inglés “Open Reading frame” (marco abierto de lectura)
PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	De sus siglas en inglés “Polimerase chain reaction”
Pfu	Unidades formadoras de placas
Post- F	Conformación post-fusión de la proteína F
Pre- F	Conformación pre-fusión de la proteína F
PS	Péptido señal
PSA	Persulfato amónico
r	Resistente
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Enzima retrotranscriptasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SPR	surface plasmon resonance
STF	Suero de ternera fetal
TEMED	N'-N'-N'-N'-tetrametil-etilendiamina
TEV	Enzima. De sus siglas en inglés “Tobacco etch virus”
TM	Región transmembranal
U	Unidades de enzima
Uff	Unidades formadoras de foco
V	Voltio
vRB12	Virus vaccinia carente del gen <i>VP37</i>
vRNA	RNA viral
vv	Virus vaccinia

RESUMEN EN INGLÉS

RESUMEN EN INGLÉS

Human metapneumovirus (hMPV) and human respiratory syncytial virus (hRSV) are members of the new *Pneumoviridae* family of viruses, recently detached from the *Paramyxoviridae* family. Both viruses, but particularly hRSV, account for the majority of bronchiolitis and severe lower respiratory tract infections worldwide in infants and very young children, and they are also a frequent cause of morbidity and mortality in the elderly and immunocompromised adults. hMPV and hRSV are similar in genomic organization, viral structure, antigenicity and clinical symptoms. There are no licensed hMPV or hRSV vaccines currently available. Efforts to control these pathogens are now focused on the prophylactic use of neutralizing antibodies against the fusion protein (F) and the development of efficacious and safety vaccines based on the F glycoprotein, which is the primary target of neutralizing antibodies and is thus a critical vaccine antigen.

The F protein promotes fusion of the virus and the cell membranes during virus entry. While the fusion membrane occurs, the F protein transits from a metastable pre-fusion conformation to a highly stable post-fusion conformation. The recently determined atomic structures of hRSV F and hMPV F in the postfusion conformation have revealed a high degree of structural similarity, including known antigenic sites such as antigenic sites II and IV. However, no cross-neutralization is observed in polyclonal antibody responses raised after immunization with purified viral F proteins, despite sporadic reports of cross-neutralizing monoclonal antibodies (mAbs).

In this Thesis we first describe the generation and characterization of a panel of mAbs based on their postfusion conformational specificity, or their neutralization activity. Some of these antibodies could be mapped onto hMPV F antigenic sites II and IV.

The main objective of this Thesis was to design chimeric F proteins in which certain antigenic sites of one virus were replaced by the equivalent antigenic site of the other virus. The antigenic changes were monitored with virus-specific mAbs to confirm that the resulting chimeric proteins gained site-specific epitopes of the heterologous virus. Moreover, mice immunization with these chimeras induced polyclonal cross-reactive and cross-neutralizing antibody responses and mice were even protected against a challenge with the virus used for grafting of the

heterologous antigenic site. These results set the path for the generation of “universal vaccines” that could protect against infections by the *Pneumoviridae*.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Clasificación del hMPV y del hRSV

El virus respiratorio sincitial humano (hRSV) se aisló por primera vez en 1955 (Blount *et al.*, 1956) y el metapneumovirus humano (hMPV) en el año 2001 (van den Hoogen *et al.*, 2001). En 2016 estos virus se han reclasificado en la recién creada familia de los *Pneumoviridae*, que agrupa a los géneros *Orthopneumovirus* y *Metapneumovirus* (Figura 1). El género *Orthopneumovirus* incluye el virus respiratorio sincitial humano (hRSV), el virus respiratorio sincitial bovino (bRSV) y el virus de la neumonía del ratón (VNR); y el género *Metapneumovirus* a los metapneumovirus humano (hMPV) y aviar (aMPV). La clasificación en estos dos géneros está basada principalmente en su constelación génica, ya que los metapneumovirus carecen de ciertas proteínas no estructurales y el orden de los genes difiere del que tienen los orthopneumovirus. Se ha elevado el status de esta nueva familia de los *Pneumoviridae* (anteriormente subfamilia dentro de los *Paramyxoviridae*) porque los miembros de este nuevo taxón están estrechamente relacionados no solo con los paramixovirus sino también con los filovirus (Afonso *et al.*, 2016).

Los virus de familia *Pneumoviridae* pertenecen al orden de los *Mononegavirales*, cuyos miembros comparten ciertas características tales como: (1) su genoma es una única molécula de RNA de polaridad negativa que se encuentra asociada con la nucleoproteína viral (formando una nucleocápsida viral que le confiere resistencia a la digestión por RNAsas) y con la polimerasa viral; (2) su RNA polimerasa transcribe el genoma de forma secuencial, dando lugar a RNA mensajeros (mRNA); (3) su ciclo replicativo es citoplasmático; (4) las partículas virales poseen una envuelta lipídica procedente de la membrana plasmática de la célula infectada, donde están ancladas las glicoproteínas virales; y (5) la entrada en la célula hospedadora se produce por la fusión de membranas del virus y de la célula.

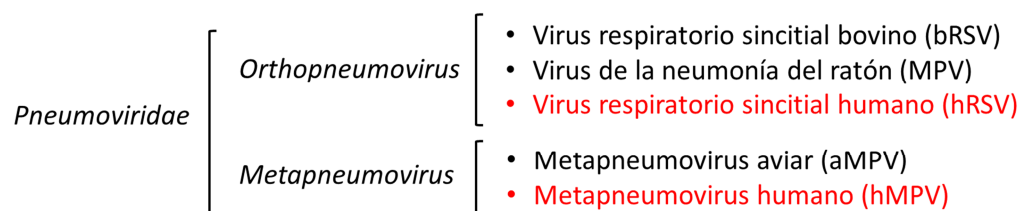


Figura 1. Clasificación de los virus de la familia *Pneumoviridae*

2. Estructura del virión del hMPV

El virión del hMPV es pleomórfico, pudiéndose observar por microscopía electrónica (ME) tanto partículas virales esféricas, con un diámetro entre 150-600nm, como formas filamentosas. Al igual que en otros *Pneumoviridae* como el hRSV (Figura 2), los viriones del hMPV tienen una nucleocápsida recubierta por una capa proteica formada por la proteína matriz (M) que está por debajo de una envuelta lipídica, característica de estos virus. En la envuelta lipídica se encuentran ancladas tres glicoproteínas virales de superficie: la glicoproteína de unión al receptor o proteína G, la proteína F encargada de la fusión de las membranas viral y celular, y una proteína pequeña, minoritaria e hidrofóbica, denominada SH. Las proteínas G y F forman las espículas que se observan al ME. La nucleocápsida viral está compuesta por el RNA viral (vRNA) al que están asociadas la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la polimerasa viral (L) y la proteína M2-1.

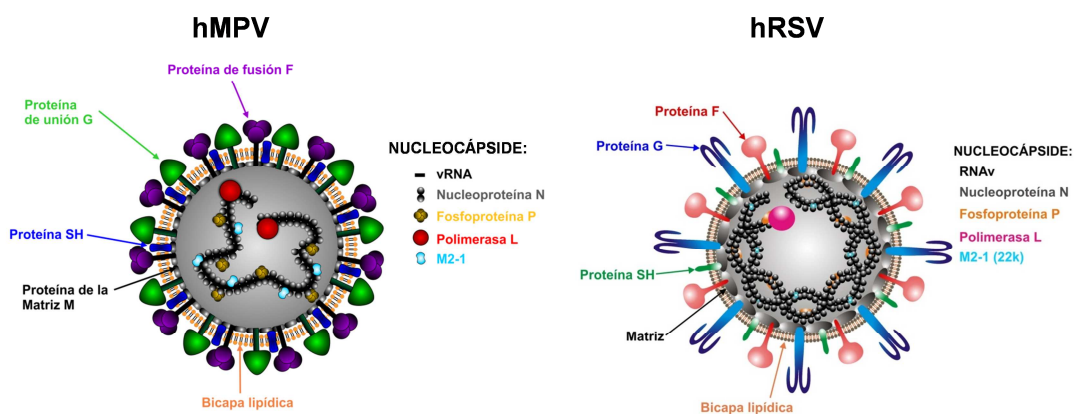


Figura 2. Representación esquemática de las partículas virales del hMPV y del hRSV. Se señala la localización de las distintas proteínas que componen el virión.

3. Organización génica

El material genético del hMPV es una molécula de RNA (vRNA) de cadena sencilla y polaridad negativa de aproximadamente 13,4 Kb (~2 Kb más corto que el del hRSV). A diferencia del genoma del hRSV, el genoma del hMPV carece de dos genes que codifican las proteínas no estructurales NS1 y NS2, y el orden de los genes F y M2 es diferente entre ambos virus en relación con el resto de genes (Figura 3). El genoma del hMPV se transcribe en ocho RNAs mensajeros (mRNAs), que codifican las proteínas virales: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), proteína de fusión (F), proteína SH, proteína de unión al receptor (G) y polimerasa viral (L) (Biacchesi *et al.*, 2003; van den Hoogen *et al.*, 2002). El gen M2 tiene dos marcos de lectura abiertos que codifican las proteínas

M2-1 (o 22K) y M2-2, por lo que el número total de proteínas codificadas por el genoma del hMPV es nueve.

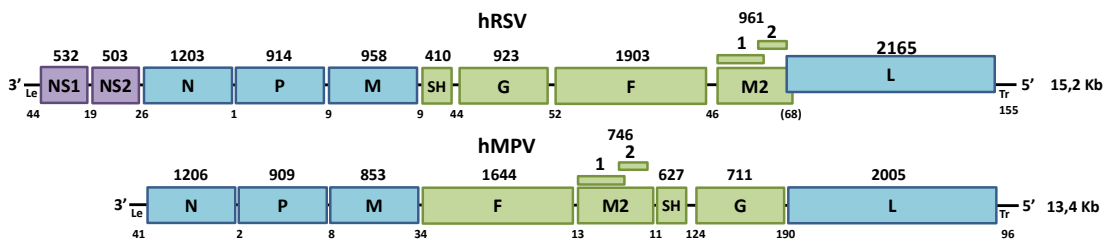


Figura 3. Esquema comparativo de los genomas del hRSV y hMPV. El mapa genético del hRSV se muestra en la parte superior y el del hMPV en la parte inferior. En color morado se muestran los genes no estructurales solo presentes en el hRSV; en azul los genes que tienen igual orden en ambos genomas y en verde los genes que varían su posición en los genomas del hRSV y el hMPV. La longitud de cada gen en nucleótidos está indicada en la parte superior de cada genoma, y las regiones intergénicas en la parte inferior.

Al igual que en el hRSV y otros virus RNA de cadena negativa no segmentada, en el extremo 3' del RNA genómico se sitúa una región no codificante denominada "leader", que contiene el único promotor utilizado tanto para la transcripción del RNA como para la síntesis del antígeno (se explicará más adelante). En su extremo 5' se localiza otra región extragénica denominada "trailer", que contiene la secuencia del promotor antígenico para la síntesis del RNA de la progenie viral. Las regiones "leader" y "trailer" tienen cierta complementariedad, porque ambas contienen elementos básicos del promotor viral (Mink *et al.*, 1991).

En ambos virus (hRSV y hMPV) la transcripción del genoma se produce de manera secuencial, dando lugar a mRNAs que adquieren una estructura "cap" en su extremo 5' (para que su traducción la lleven a cabo los ribosomas de la célula infectada) y una cola de poli-A en el extremo 3'. Sin embargo, la replicación del vRNA comprende la síntesis de una copia completa en sentido positivo del genoma (complementaria), denominada antígeno que no posee "cap" ni está poliadenilado. Ambos procesos, transcripción y replicación, se producen en el citoplasma.

Al igual que en otros pneumovirus y paramixovirus, cada gen del hMPV comienza con una secuencia consenso denominada "Gene Start" (GS) CCCUGUUU/CA, y el codón de inicio de cada ORF se encuentra 4 nucleótidos después de esta secuencia (van den Hoogen *et al.*, 2002). Esta región GS está altamente conservada entre todos los genes excepto en los genes L y SH, que es ligeramente distinta. La región GS también está presente en los genes del hRSV,

con una secuencia muy similar (CCCCGUUUA(U/C)) (Biacchesi *et al.*, 2003). Su función es la de determinar el inicio de la transcripción. Los genes finalizan con una secuencia de 12-15 nucleótidos menos conservada denominada “Gene End” (GE) (UCAAUnnnUUUU), que dirige la terminación de la transcripción y la poliadenilación del mRNA.

En ambos virus, los genes están separados por regiones intergénicas de longitud y secuencia variable (2 a 190 nucleótidos) tanto entre las distintas regiones intergénicas de los distintos genes que componen el genoma del hMPV, como entre las regiones intergénicas de otras cepas del hMPV o de otros virus relacionados (Biacchesi *et al.*, 2003).

4. Ciclo replicativo del hMPV

El ciclo infectivo del hMPV es análogo al del hRSV (Collins PL and Karron RA, 2013). Un esquema de las diversas etapas del ciclo infectivo del hMPV se muestra en la Figura 4. La infección comienza con la unión del virus a la célula hospedadora, mediada principalmente por la proteína G. Diversos estudios sugieren que esta proteína se une a glicosaminoglicanos presentes en la membrana de la célula como el heparán sulfato (Thammawat *et al.*, 2008). Tras la unión se produce la activación de la proteína F que va a promover la fusión de las membranas viral y celular (se explicará en el apartado 9.1). La proteína matriz (M), que rodea la parte interna de la bicapa lipídica, se desestructura y permite la liberación de la nucleocápsida viral al citoplasma celular.

Se ha propuesto un modelo común de transcripción y replicación para todos los pneumovirus y paramixovirus (Lamb and Jardetzky, 2007). Según este modelo, la transcripción se produce de forma secuencial y polar a partir de un único promotor de la transcripción, situado en la región “leader” del extremo 3’ del RNA viral (vRNA). La polimerasa se une al promotor viral y lleva a cabo la transcripción del genoma por un mecanismo secuencial de inicio, terminación y reiniciación de la síntesis de RNA que producirá una serie de mRNAs. Para ello, la polimerasa viral se guía por las señales antes mencionadas GS y GE muy conservadas y presentes en los extremos de cada gen (Dickens *et al.*, 1984; Fearn and Collins, 1999; Kuo *et al.*, 1996b).

El complejo de la transcripción está formado por al menos las proteínas L, P y M2-1. Este complejo reconoce a las secuencias GS y transcribe el gen completo,

hasta que llega a la secuencia GE, momento en el que se detiene la transcripción y se produce la poliadenilación por copia reiterada de las secuencias ricas en Us. El complejo de la polimerasa atraviesa entonces una región intergénica no codificante, sin soltarse del RNA molde, hasta que encuentra de nuevo otra secuencia GS, iniciando de nuevo la transcripción del siguiente gen. (Kuo *et al.*, 1996a).

Como en el resto de los mononegavirales, la transcripción secuencial genera un gradiente polar de abundancia de los mRNAs. Los mRNAs de los genes más cercanos al extremo 3' son más abundantes, ya que, cuando la polimerasa finaliza la transcripción de un gen, tiene cierta probabilidad de soltarse del molde y no transcribir el siguiente gen. La longitud y secuencias variables de las regiones intergénicas contribuyen también a modular la abundancia de los distintos mRNAs (Hardy *et al.*, 1999).

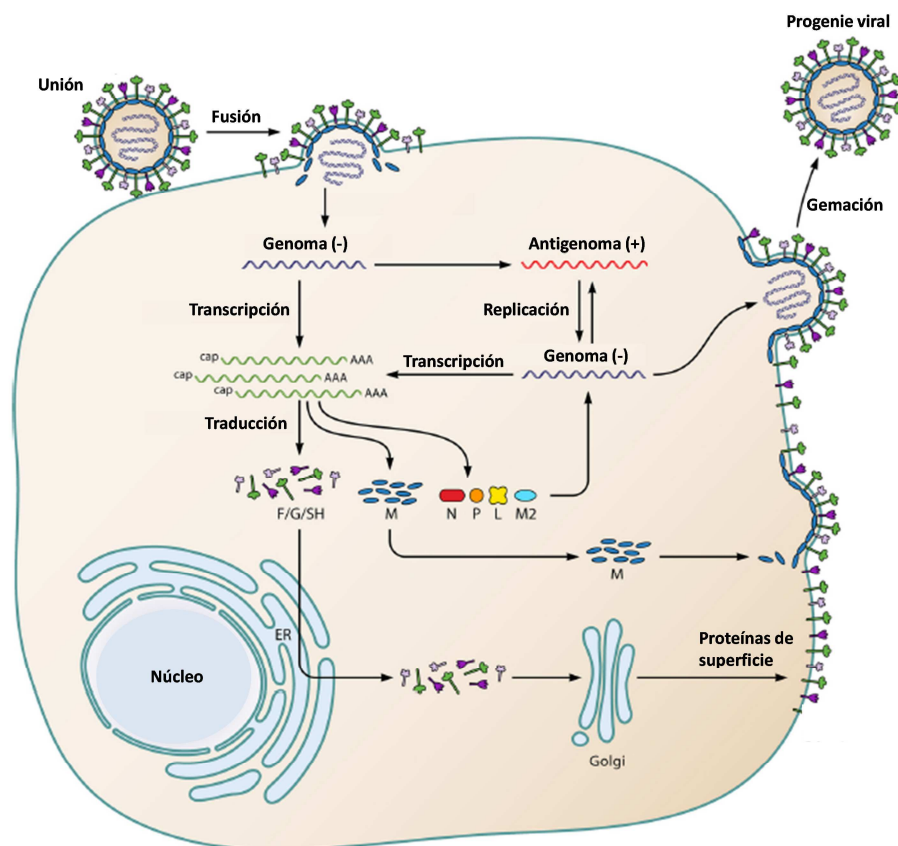


Figura 4. Esquema del ciclo replicativo del hMPV.

Modificado de Schilden *et al.*, 2011

La replicación del RNA se produce cuando la polimerasa, por algún mecanismo aún desconocido, ignora las señales de inicio y terminación de la

transcripción y sintetiza un intermediario replicativo denominado antígenoma (cRNA). El antígenoma es una copia completa del vRNA pero de polaridad positiva que sirve de molde para la síntesis de genomas completos que se incorporarán a la progenie viral. Se piensa que la replicación se produce cuando en la célula infectada se ha acumulado una cantidad de proteína N suficiente para que, a medida que se va sintetizando el cRNA, este vaya siendo encapsidado por la proteína N libre. Además, en el caso del hRSV el cambio de transcripción a replicación está modulado de alguna manera por la proteína M2-2. Así la inactivación de la expresión de la proteína M2-2 da lugar a un virus atenuado en el que la producción de mRNA está aumentada respecto a la de vRNA (Bermingham and Collins, 1999). Se asume que la proteína M2-2 desempeña un papel similar en el ciclo replicativo del hMPV.

Las glicoproteínas de superficie (F, G y SH), tras pasar por el retículo endoplásmico y por el Golgi, se dirigen a la membrana plasmática de la célula por la vía exocítica. La proteína M, situada en la cara interna de la membrana plasmática, coordina el ensamblaje del virión, interaccionando simultáneamente con la nucleocápsida y con las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas de superficie insertadas en la membrana plasmática de la célula. Las nuevas partículas virales incorporan por tanto la envuelta lipídica procedente de la célula infectada y salen de la célula por gemación.

5. Epidemiología

El virus respiratorio sincitial humano (hRSV) es el principal agente etiológico causante de infecciones agudas de las vías respiratorias en niños menores de dos años. Un estudio prospectivo llevado a cabo en EEUU mostró que, cada año, uno de cada trece niños menores de cinco años que requiere atención médica primaria, se debe a una infección por hRSV (Hall *et al.*, 2009) y que estas representan el 23,3% de las hospitalizaciones por infecciones del tracto respiratorio (ITR). Se estima que, cada año, se producen alrededor de 34 millones de nuevas infecciones del hRSV en niños menores de 5 años, causando 66.000-199.000 muertes cada año, la mayoría de ellas en países desarrollados (Nair *et al.*, 2010). Diversos estudios retrospectivos han demostrado que el metapneumovirus humano (hMPV) también tiene un gran impacto clínico en niños de corta edad. Se estima que entre un 5-10% de los niños hospitalizados con ITR son positivos para el hMPV (Esper *et al.*, 2004). La práctica totalidad de los niños menores de dos años han sido infectados por el hRSV (Glezen *et al.*, 1986) y ocurre lo mismo con el hMPV, donde

la mayoría de los niños antes de los 5-10 años han sido expuestos al hMPV (Ebihara *et al.*, 2003; van den Hoogen *et al.*, 2001).

Las reinfecciones son frecuentes tanto en el caso del hMPV como del hRSV. Entre el 5 y el 10% de los adultos se infectan anualmente por estos virus (Falsey, 2007), pero en individuos sanos la sintomatología suele ser leve y los casos de hospitalización muy poco frecuentes debido a que la inmunización inducida por exposiciones anteriores al virus parece reducir la infección por el virus y los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, en ancianos debido a su inmunosenescencia, o en adultos con enfermedades cardiopulmonares y en individuos inmunocomprometidos, especialmente aquellos con deficiencias en linfocitos T, existe un riesgo elevado de desarrollo de infecciones graves causadas por estos virus.

Las infecciones por ambos virus tienen un patrón estacional, con brotes epidémicos de 4-5 meses y con su pico máximo de incidencia en enero en el hemisferio norte para hRSV y 1-2 meses más tarde para el hMPV (Heininger *et al.*, 2009; Pilger *et al.*, 2011). Dado el solapamiento estacional existente entre estos virus, se han descrito frecuentemente co-infecciones de ambos virus así como con otros virus como el virus de la gripe (Greensill *et al.*, 2003). Esto probablemente ha hecho que las infecciones por hMPV se hayan subestimado, pues la mayor parte de los estudios se realizaron con muestras negativas para otros virus.

6. Variabilidad genética del hMPV

Las secuencias de nucleótidos de aislados del hMPV han demostrado la existencia de dos linajes genéticos, A y B (Biacchesi *et al.*, 2003; Boivin *et al.*, 2002; Peret *et al.*, 2002; van den Hoogen *et al.*, 2002), con una identidad de secuencia de nucleótidos del 80% en promedio entre ambos linajes y una identidad del 92-93% entre cepas del mismo linaje. Análisis filogenéticos posteriores realizados con secuencias parciales de la proteína F y secuencias completas de la proteína G revelaron que cada linaje se dividía a su vez en dos sublinajes, 1 y 2 (Papenburg *et al.*, 2013; van den Hoogen *et al.*, 2004). La proteína F posee una identidad de secuencia de nucleótidos del 94-97% entre los linajes A y B, y >98% entre los sublinajes (A1 y A2, B1 y B2 respectivamente). La mayor variabilidad genética se observó en la proteína de unión al receptor G, donde solo hay un 30-35% de identidad de secuencia de nucleótidos entre virus de los linajes A y B.

En lo que a identidad de secuencia de aminoácidos se refiere, el linaje A del hMPV tiene un alto grado de homología de secuencia con aislados del linaje B en todos sus genes, a excepción de los codifican para las proteínas SH y G (Tabla 1). Comparando el hMPV linaje A con otros virus pertenecientes a la familia de los *Pneumoviridae*, hay una elevada identidad de secuencia de aminoácidos con otros virus del género *metapneumovirus* como el metapneumovirus aviar tipo C (aMPV C). Ahora bien, esa identidad de secuencia se reduce a <50% en promedio cuando se compara con virus del género *orthopneumovirus* como el hRSV. En el caso de la proteína F, de la que se hablará con más detalle en sucesivos apartados de la tesis, la identidad de secuencia de aminoácidos entre los distintos linajes del hMPV es del 95% mientras que la identidad de secuencia entre la proteína F del hMPV (linaje A) y la del hRSV (tipo A) es tan solo de un 33% (van den Hoogen *et al.*, 2001).

Virus	N	P	M	SH	G	F	M2-1	M2-2	L
hMPV B	96	85	97	59	37	95	96	89	89
aMPV C	88	68	87	24	23	81	83	56	80
hRSV A	42	35	38	23	15	33	36	17	45
bRSV	44	22	38	ND	ND	34	35	13	ND
PVM	44	21	37	ND	ND	33	34	12	ND

Tabla 1. Porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos entre las proteínas del hMPV (linaje A) y representantes de todos los pneumovirus. Los virus están ordenados de mayor a menor homología de aminoácidos con el hMPV (linaje A). Los números en negrita y cursiva resaltan la identidad de secuencia de las proteínas F, por su importancia en esta tesis. aMPV C: metapneumovirus aviar tipo C, hRSV A: virus respiratorio sincitial humano del grupo A; bRSV: virus respiratorio sincitial bovino; PVM: virus de la neumonía del ratón. ND, no determinado.

7. Patogénesis y diagnóstico

La infección por el hMPV y el hRSV comienza en las células epiteliales de las vías respiratorias altas y tiene un periodo de incubación de 4-5 días. En los casos más graves, se produce una diseminación de la infección a las vías respiratorias bajas, causada por la infección de células adyacentes y por la aspiración de secreciones nasofaríngeas. La sintomatología que producen el hRSV y el hMPV es indistinguible, pero suele ser más leve en infecciones producidas por el hMPV (Boivin *et al.*, 2002). Se ha descrito un amplio cuadro de síntomas clínicos asociados a infecciones por estos virus en pacientes de todas las edades, que van desde infecciones leves del tracto respiratorio (ITR) hasta infecciones graves que requieren hospitalización e incluso pueden causar la muerte. En el caso del hMPV no hay consenso sobre si la gravedad de la infección está asociada a la infección por virus de diferentes sublinajes (Agapov *et al.*, 2006; Kaida *et al.*, 2006).

En general, en niños menores de 5 años, estas infecciones se presentan con síntomas leves tales como fiebre, congestión nasal, tos, faringitis y otitis media; y la duración de los síntomas suele ser de una semana. En los casos más graves (30-50% de los casos de infecciones por hRSV), la infección se expande a las vías respiratorias bajas donde se pueden producir cuadros clínicos como rinofaringitis, bronquiolitis o neumonía, llegando a causar la muerte. En adultos sanos se suelen observar los síntomas típicos del resfriado común, como tos, congestión nasal, ronquera, dolor de garganta y fiebre leve.

También se han descrito cuadros clínicos muy poco frecuentes, como episodios de sensibilización al asma en niños con enfermedad grave por hRSV (Collins and Graham, 2008) o el desarrollo de encefalopatías producidas por el hMPV (Niizuma *et al.*, 2014).

No es posible realizar un buen diagnóstico clínico diferencial entre estos virus y otros agentes causantes de ITRs en niños de muy corta edad, por la semejanza entre los síntomas que pueden desarrollar. El diagnóstico más fiable es el aislamiento de virus procedente de secreciones respiratorias en cultivos celulares. Pero la labilidad del hRSV y el lento crecimiento del hMPV imposibilitan el uso de esta técnica en la práctica clínica. Por eso las pruebas de detección rápidas son de gran importancia para evitar el uso indebido de antibióticos. La utilización de anticuerpos monoclonales comerciales permite la detección de antígeno viral de forma rápida por métodos inmunoquímicos pero normalmente son métodos que tienen baja sensibilidad (Landry *et al.*, 2005). En general se recomienda la detección de RNA viral por RT-PCR en lavados nasofaríngeos como método más fiable (Ebihara *et al.*, 2005; Landry *et al.*, 2005).

8. Respuesta inmune frente al hMPV

La respuesta inmune juega un papel determinante en la protección y en la recuperación de la infección por el hMPV y el hRSV. Los anticuerpos neutralizantes juegan un papel primordial en la protección frente a la infección por ambos virus (Alvarez *et al.*, 2004; Hamelin *et al.*, 2005; MacPhail *et al.*, 2004; van den Hoogen *et al.*, 2007), mientras que la respuesta celular tiene un papel más significativo en la eliminación los mismos.

8.1. Barreras físicas e inmunidad innata

La primera línea de defensa del huésped frente a una infección por el hMPV o el hRSV incluye las barreras físicas del glicocalix de la superficie de las células epiteliales y de la capa de mucosa presente en las vías respiratorias.

Tras la infección por el hRSV, las células epiteliales y las células dendríticas plasmacitoides de las vías aéreas producen interferón (IFN) α/β (tipo I), que inhibe directamente la replicación del virus y activa además rutas de señalización intracelulares que conducen a un “estado antiviral” en las células adyacentes que aún no han sido infectadas.

Además, los Toll-like receptors (TLRs) presentes en la membrana plasmática de células de las vías respiratorias también juegan un papel importante en la respuesta inmune innata frente a una infección por estos virus. Así, la proteína F estimula los TLR4 en leucocitos que promueven la activación de la ruta NF- κ B que conduce a la producción de citoquinas IL-6 e IL-8 y la inducción de IFN tipo I. Otros TLRs también están implicados en la respuesta frente a estos virus, aunque su mecanismo de acción aún no está claro. Las cascadas de señales mediadas por citoquinas y quimioquinas así generadas inducen una respuesta inflamatoria local y además facilitan la activación de la respuesta inmune adaptativa, tanto humoral (anticuerpos) como celular.

8.2. Inmunidad humoral

La prevalencia de anticuerpos séricos frente al hMPV en niños mayores de 10 años es del 100%, lo que quiere decir que virtualmente todas las personas se han infectado por el hMPV al menos una vez en su vida (van den Hoogen *et al.*, 2001). Los niños recién nacidos tienen anticuerpos IgG transferidos por la madre a través de la placenta. Existe una correlación positiva entre el título de anticuerpos maternos transferidos, el retardo de la infección y una patología más suave tras la primera infección frente al hRSV (Crowe, Jr. *et al.*, 2001). Los anticuerpos maternos suelen ser de la subclase IgG1, y comienzan a atravesar la barrera placentaria aproximadamente a las 26 semanas de gestación y continúan hasta el nacimiento del niño. Es por eso que los niños prematuros tienen títulos de anticuerpos neutralizantes y protectores más bajos y esto incrementa su susceptibilidad a la infección (Collins *et al.*, 2013). Tras unos meses, el título de anticuerpos maternos protectores disminuye. Debido a la inmadurez del sistema inmune tanto celular como humoral, el periodo más frecuente de primoinfección por

estos virus es entre los 2 y 6 meses de edad. Tras la primera infección, los títulos de anticuerpos neutralizantes son indistinguibles entre los niños que nacieron con elevados títulos de anticuerpos maternos y los que tuvieron títulos bajos (Shinoff *et al.*, 2008). A medida que los niños van creciendo, se van produciendo reinfecciones y los niveles de IgG frente a las proteínas F y G van en aumento.

Además de las IgG circulantes en el suero, los anticuerpos IgA de las mucosas y del tracto respiratorio tienen un papel protector importante frente a la infección por diversos agentes infecciosos (Freihorst and Ogra, 2001). Los anticuerpos IgA son particularmente eficientes en la restricción de la replicación del hRSV (Kaul *et al.*, 1981) y estudios en animales demostraron que existe una correlación entre los niveles de IgA específicos frente al hMPV en el tracto respiratorio y los niveles de protección frente a la infección (Mok *et al.*, 2008).

En modelos animales se ha demostrado que la proteína F es el único antígeno viral capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y protectores frente al hMPV (Biacchesi *et al.*, 2005; Mok *et al.*, 2008; Skiadopoulos *et al.*, 2006; Skiadopoulos *et al.*, 2004a; Tang *et al.*, 2003). Debido a la importancia de la glicoproteína F en la inducción de anticuerpos neutralizantes y protectores frente a una infección por el hMPV, en el siguiente apartado de esta tesis (apartado 9) se describirán con detalle las características estructurales, antigénicas e inmunogénicas de las proteínas F del hMPV y se compararán con las del hRSV.

8.3. Inmunidad celular

Tras la infección, las células NK son las primeras en llegar al tracto respiratorio y producen INF γ que promueve la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ con actividad citolítica específica frente a las células infectadas. También contribuyen a la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ “helper”, que intervienen en la activación y amplificación de las respuestas inmunes celular y humoral. Las células NK también parecen tener un papel directo en el control de la infección, ya que en ratones deplecionados de células NK los títulos de virus en sus pulmones aumentaron significativamente (Alvarez *et al.*, 2004). En pacientes inmunocomprometidos las infecciones por hMPV y hRSV son más graves. Esto sugiere que los linfocitos T juegan un papel importante en la eliminación del virus (Cane *et al.*, 2003; Martino *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2006). Ratones deficientes en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tuvieron títulos mayores de virus en los pulmones que los grupos control. Pero esos ratones también mostraron menor pérdida de peso y

efectos citopatológicos menos agresivos que el grupo control, lo que sugiere que la respuesta inmunológica frente al virus contribuye en cierta manera al desarrollo de la enfermedad y a su gravedad (Kolli *et al.*, 2008). Estudios recientes en ratones han evidenciado que los macrófagos promueven una respuesta inmediata mediada por citoquinas pro-inflamatorias tras una infección por el hRSV, y que estas células son las mayores productoras de INF tipo I (Pribul *et al.*, 2008).

9. Glicoproteína F

La proteína de fusión (F) de los paramixovirus y pneumovirus desempeña un papel primordial en la infección viral, promoviendo la fusión de las membranas viral y celular, que ocurre normalmente a pH neutro. La fusión de las membranas permite la liberación de la nucleocápsida del virus al citoplasma de la célula hospedadora iniciándose así la fase citoplasmática del ciclo infeccioso. La proteína F sintetizada en la célula infectada se localiza en su membrana plasmática facilitando así la fusión de esa membrana con la de células adyacentes dando lugar a células gigantes y multinucleadas denominadas sincitios (Walsh and Hruska, 1983).

La proteína F de los pneumovirus y paramixovirus es una glicoproteína de fusión tipo I que se sintetiza como un precursor inactivo denominado F0 (Calder *et al.*, 2000; Russell *et al.*, 1994). En el caso del hMPV el precursor tiene una longitud de 539 aminoácidos y su secuencia está altamente conservada (94-97%) entre los linajes A y B. Ese precursor necesita ser procesado proteolíticamente para que la proteína sea biológicamente activa. En el caso del hMPV, el corte proteolítico ocurre extracelularmente, por lo que para el crecimiento del virus en cultivos celulares se necesita la adición de tripsina al medio de cultivo (Schowalter *et al.*, 2006) *In vivo* ese procesamiento se produce por serin-proteasas del tipo TMPRSS2 que se encuentran en el lumen del tracto respiratorio (Shirogane *et al.*, 2008). Como resultado del procesamiento proteolítico se generan dos subunidades F1 y F2, que permanecen unidas covalentemente por dos puentes disulfuro, como puede verse en el esquema de la Figura 6. La proteína F madura es un homotrímero compuesto por tres heterodímeros (F2+F1) que se incorpora a la membrana del virus en una conformación metaestable, denominada pre-fusión.

El tamaño de las proteínas F del hMPV y hRSV difiere fundamentalmente debido a los distintos procesamiento proteolíticos que experimentan ambas proteínas. La proteína F del hMPV, como en otros *Pneumoviridae* y *Paramixoviridae*, solo tiene un sitio de procesamiento proteolítico por proteasas

tipo tripsina, situado después del residuo 101 e inmediatamente antes de una región hidrofóbica denominada péptido fusión (van den Hoogen *et al.*, 2002). Sin embargo, la proteína F del hRSV tiene dos sitios de procesamiento proteolítico por proteasas tipo furina, separados por 27 aminoácidos (péptido p27). Tras el procesamiento proteolítico de la proteína F del hRSV se libera el péptido p27, que no se encuentra en la proteína madura (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2001).

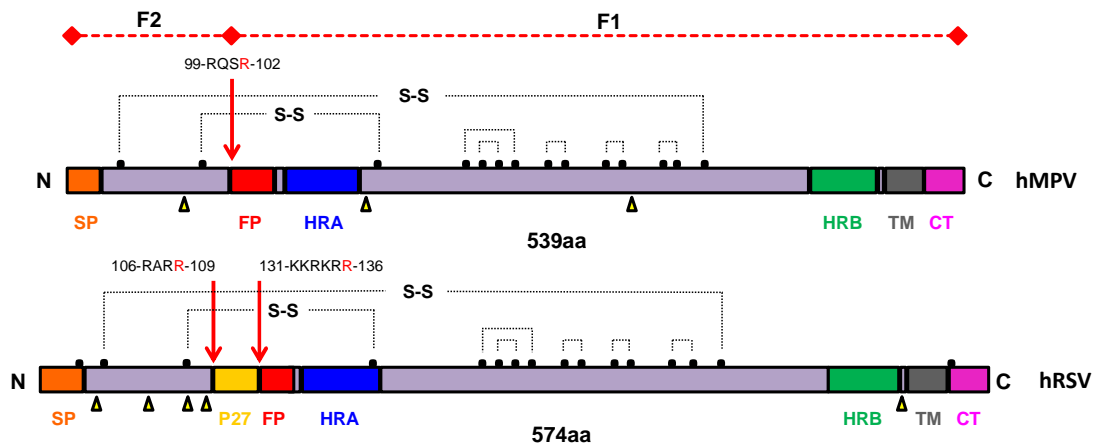


Figura 6. Esquema comparativo de la estructura primaria de las proteínas de fusión F del hMPV y hRSV. SP: péptido señal; FP: péptido de fusión; HRA: región heptádica A; HRB: región heptádica B; TM: región transmembrana; CT: cola citoplasmática. Las flechas rojas señalan los sitios de corte proteolítico. Los puntos negros indican los residuos de cisteína. S-S puentes disulfuro. Triángulos amarillos indican los sitios de N-glicosilación.

El precursor F0 tiene tres regiones hidrofóbicas: (1) el péptido señal (SP), que se localiza en el extremo N-terminal de la proteína y se pierde cuando la proteína se transloca al retículo endoplásmico durante su síntesis; (2) la región transmembranal (TM) situada cerca del extremo C-terminal, cuya función es anclar la proteína a la envuelta lipídica; (3) el péptido fusión (FP), situado en la parte N-terminal de la subunidad F1 y que se inserta en la membrana de la célula hospedadora en las etapas iniciales de la fusión de membranas.

Al igual que las demás glicoproteínas de fusión tipo I de los paramixovirus y del resto de los pneumovirus, la proteína F del hMPV tiene dos regiones heptádicas situadas en la cadena F1, denominadas HRA y HRB. Las regiones HRA y HRB tienen un papel fundamental en el proceso de fusión de membranas (ver apartado siguiente) y en la estabilización de la proteína en su conformación post-fusión. Son regiones con alta tendencia a formar α -hélices, y en la conformación post-fusión de esas proteínas los aminoácidos que ocupan las posiciones "a" y "d" de cada héptada son hidrofóbicos y están situados en el mismo lado de la α -hélice (Lambert *et al.*, 1996). En el caso de la proteína F del hRSV (al

igual que ocurre en otros *Paramixoviridae*), se ha observado que péptidos derivados de las HRA y HRB mezclados en cantidades equimolares forman un complejo similar al dominio 6-HB (Lawless-Delmedico *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Además, este complejo se pudo cristalizar y determinar su estructura atómica, observándose un “core” de tres α -hélices de las HRA enrolladas entre sí y recubiertas antiparalelamente por tres α -hélices de las HRB.

La subunidad F1 de la proteína F del hMPV, como la del resto de los pneumovirus, posee 12 residuos de cisteína (Cys) de los que siete están también presentes en las proteínas F de pneumovirus y paramixovirus. La subunidad F2 tiene dos residuos Cys, uno de ellos conservado en otros pneumovirus y paramixovirus (van den Hoogen *et al.*, 2002). Como ya se mencionó anteriormente, las cadenas F1 y F2 se mantienen unidas covalentemente por la formación de dos puentes disulfuro entre dos residuos Cys de la cadena F2 y dos residuos Cys de la cadena F1 (Figura 6). El resto de los residuos Cys de la cadena F1 forman 5 puentes disulfuro intercatenarios que dan estabilidad al protómero. La proteína F del hMPV también tiene tres sitios de N-glicosilación, dos de los cuales no tienen equivalente en la proteína F del hRSV. (Schowalter *et al.*, 2006).

9.1. Proceso de fusión de membranas

La fusión de las membranas viral y celular es una etapa clave en el proceso infectivo de los virus con envuelta. En la Figura 7 se muestra un modelo del mecanismo de fusión de membranas mediada por la proteína F de los paramixovirus (Yin *et al.*, 2006). La proteína F en su forma biológicamente activa está anclada a la partícula viral en una estructura meta-estable denominada pre-fusión. Esta conformación de la proteína tiene una cabeza globular unida a la membrana viral por un tallo corto formado por tres α -hélices superenrolladas provenientes de la región HRB de cada protómero. En la cabeza de la proteína se encuentran las tres secuencias HRA formando α -hélices cortas unidas por “loops” (McLellan *et al.*, 2013b).

Una vez que el virus se ha unido a la superficie de la célula diana, la proteína F se activa y experimenta una serie de cambios conformacionales. Estos cambios (no bien conocidos) implican la reorganización de las secuencias de las HRAs para formar tres α -hélices largas y superenrolladas en cuyo extremo N-terminal se localiza el péptido fusión que, al ser una región hidrofóbica, se inserta

en la membrana de la célula diana formando una estructura inestable que se conoce como “pre-harpin”.

Posteriormente se produce un acercamiento de las estructuras HRA y HRB lo que conlleva la aproximación de las membranas del virus y de la célula. Al final del proceso, el péptido de fusión y el dominio transmembranal quedan insertados en la misma membrana y las estructuras HRA y HRB se reorganizan en un bucle de 6- α -hélices (6-HB) en el que las tres HRA quedan en el interior rodeadas por tres hélices antiparalelas de las HRB. Así, la proteína F adquiere una conformación muy estable denominada post-fusión, concomitante con la formación de un poro de fusión entre las dos membranas por donde se libera la nucleocápsida al citoplasma celular.

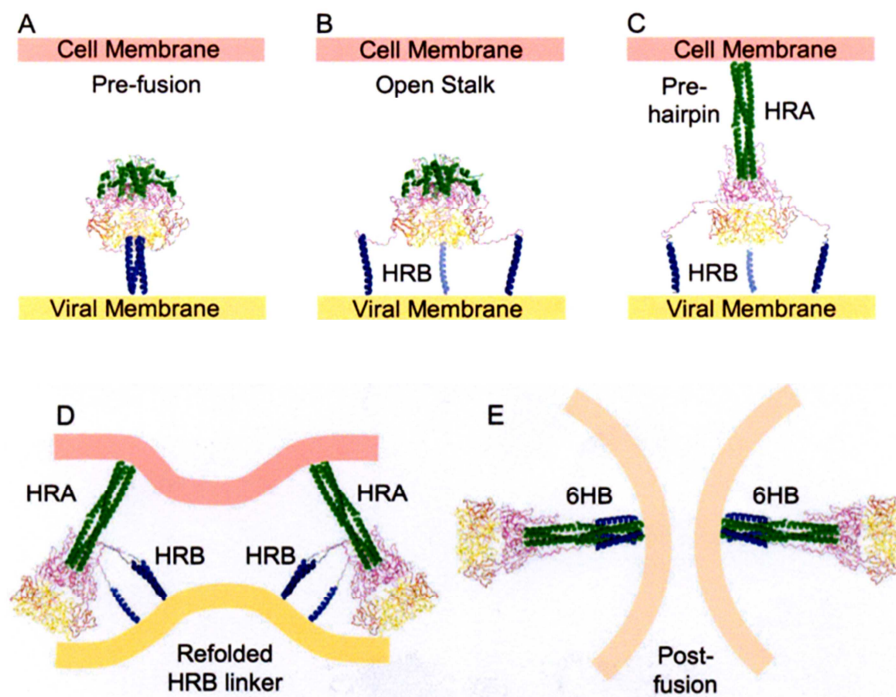


Figura 7. Modelo de fusión de membranas mediado por la proteína F de los pneumovirus y paramixovirus propuesto por Yin y col. (2006). A. La proteína F en su conformación pre-fusión está anclada a la membrana viral. B. Tras la unión del virus a la célula, la proteína F se activa. Las HRBs (azul) se separan y las HRAs (verde) se reorganizan en tres α -hélices largas que exponen el péptido de fusión en su extremo N-terminal. C. El péptido de fusión se inserta en la membrana de la célula diana formándose un intermediario conocido como “pre-hairpin”. D. Las HRAs y HRBs se repliegan y conducen a un acercamiento de las membranas. E. Formación del poro de fusión y estructura final de la proteína F en su conformación post-fusión con la estructura de las 6- α -hélices (6-HB) característica de esta conformación.

Los paramixovirus necesitan dos glicoproteínas de superficie para promover la fusión de membranas, una es la proteína de adhesión (HN, H o G) y otra la proteína de fusión (F). Según el modelo más extendido, la proteína de adhesión tras su unión al receptor transmite una señal a la proteína F para activarla y así iniciar los cambios conformacionales arriba indicados (Lamb, 1993). En cambio los pneumovirus no requieren la proteína de unión al receptor (G) para promover la fusión de membranas. Así, mutantes del hRSV (Karron *et al.*, 1997a; Karron *et al.*, 1997b) y del hMPV (Biacchesi *et al.*, 2005) con el gen de la proteína G deletado son capaces de fusionar membranas y replicarse en células en cultivo, aunque en modelos animales la replicación del hRSV Δ G y del hMPV Δ G está disminuida. Por tanto, para los pneumovirus, la proteína F es necesaria y suficiente para la fusión de membranas sin requerimientos de una proteína de unión, en claro contraste con lo que ocurre en los paramixovirus (Biacchesi *et al.*, 2004; Techaarpornkul *et al.*, 2001).

Puesto que los pneumovirus no necesitan la proteína de unión al receptor (G) para promover la fusión de membranas, la proteína F debe facilitar la unión del virus a receptores celulares, al menos en los virus que carecen de la proteína G. Se ha propuesto un modelo secuencial de adhesión del virus, donde la proteína F del hMPV se uniría al heparán sulfato como primer receptor celular de baja afinidad (Chang *et al.*, 2012). Tras esta primera unión, la proteína F se uniría a receptores proteicos de la célula, entre los que se incluyen las integrinas α V β 1 (Cox *et al.*, 2012). Estas integrinas α V β 1 se unirían al motivo RGD (residuos 329-331) presente en la subunidad F1 de la proteína y que está conservado en todos los aislados del hMPV estudiados hasta la fecha. El bloqueo de esas integrinas con AcMs específicos o con siRNAs, inhiben la infectividad del hMPV, lo que sugiere que las integrinas α V β 1 actúan como receptores para la adhesión del virus. Pero en la estructura pre-fusión de la proteína F del hMPV recientemente obtenida el motivo RGD no está accesible para la unión a integrinas, lo que cuestiona la interacción de las integrinas con la forma pre-fusión de la proteína F y su implicación en el proceso de la fusión de membranas (Battles *et al.*, 2017).

En los pneumovirus y paramixovirus, la activación de la proteína F y la consiguiente fusión de membranas ocurre a pH neutro (Lamb, 2013). Sin embargo, un primer trabajo publicado sobre la fusión célula-célula mediada por la proteína F del hMPV sugería que dicho proceso requería un pH ácido (Schowalter *et al.*, 2006) de manera análoga a como ocurre con otras proteínas de fusión tipo I, como

la hemaglutinina del virus de la gripe, cuyo virus entra en la célula por endocitosis. Sin embargo, Herfst y col. demostraron que la dependencia de pH es una característica restringida a cepas minoritarias del sublinaje A1 (~6%), mientras que cepas del sublinaje A2 y del linaje B eran capaces de inducir la formación de sincitios de manera independiente al pH (Herfst *et al.*, 2008a). Un extenso análisis de proteínas F mutantes permitió identificar cuatro residuos variables en las posiciones 294, 296, 396 y 404, determinantes de la dependencia o no de un pH ácido para la activación de la proteína F y la consecuente fusión de membranas (Mas *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque el pH ácido puede contribuir a la activación de la proteína F de ciertas cepas del hMPV, no puede ser el mecanismo general de activación de la proteína F, que aún se desconoce.

9.2. Caracterización de las proteínas F pre- y post-fusión del hMPV

En los últimos años, en nuestro laboratorio, se ha determinado la estructura atómica de la proteína F del hMPV tanto en su conformación pre-fusión (Battles *et al.*, 2017) como post-fusión (Mas *et al.*, 2016). Estas estructuras han ayudado a entender los cambios estructurales que experimenta la proteína F durante la fusión de membranas. Previamente se habían determinado las estructuras de la proteína F del hRSV en su conformación pre-fusión (McLellan *et al.*, 2013a; McLellan *et al.*, 2013c) y post-fusión (McLellan *et al.*, 2011b). Las Figuras 8 y 9 muestran las estructuras de la forma post-fusión y pre-fusión, respectivamente, de la proteína F del hMPV en comparación con estructuras equivalentes de la proteína F del hRSV.

La forma post-fusión de la proteína F del hMPV se purificó a partir del sobrenadante de células infectadas con un virus vaccinia recombinante que expresaba el ectodominio de la proteína F fusionado en su extremo C-terminal al dominio de oligomerización de la fibritina del bacteriófago T4 (Foldon). Al igual que la proteína F del hRSV y de otros paramixovirus, la proteína F post-fusión del hMPV tiene forma de cono (Figura 8) (Yin *et al.*, 2005).

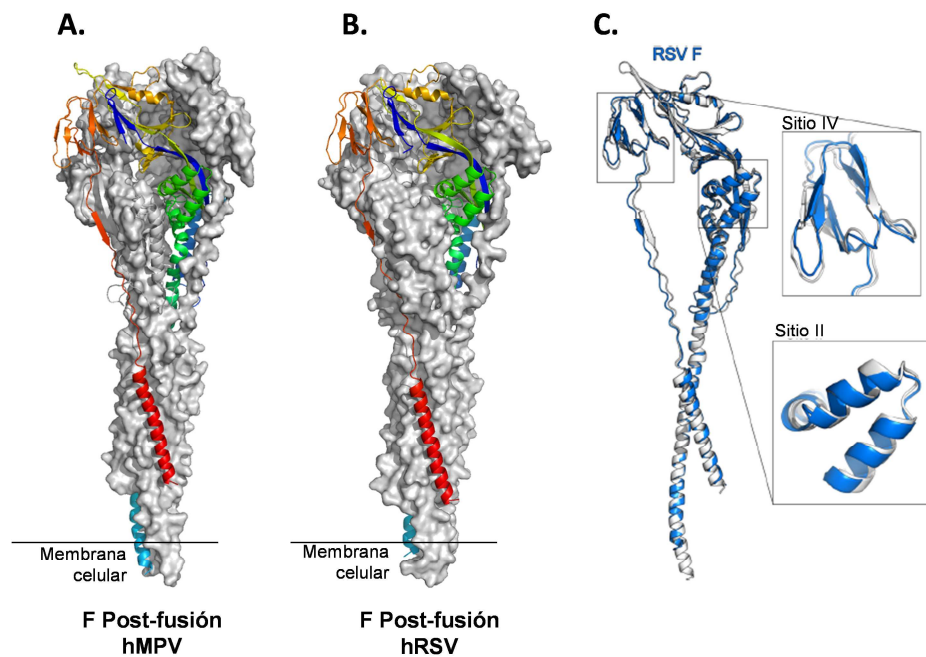


Figura 8. Estructuras de las proteínas F del hMPV (A) y del hRSV (B) en su conformación post-fusión y comparación entre ellas (C). Los paneles A y B muestran trímeros de las proteínas F post-fusión del hMPV y hRSV respectivamente. Se muestran los motivos de estructura secundaria de uno de los protómeros coloreados en modo arco iris y los otros dos protómeros se muestran como superficies moleculares coloreados en gris. El panel C muestra una superposición de un protómero de la proteína F post-fusión del hMPV (blanco) y del hRSV (azul). Los sitios antigénicos II y IV, de relevancia en la inducción de anticuerpos neutralizantes, se muestran ampliados.

El tallo de la proteína está formado básicamente por el motivo 6-HB de los tres protómeros. La cabeza tiene forma angular y está formada por el resto de la subunidad F1 y por la subunidad F2 completa (Mas *et al.*, 2016). Aunque los ectodominios maduros de las proteínas F del hMPV y el hRSV comparten tan solo un 38% de identidad de secuencia de aminoácidos, sus estructuras post-fusión son muy parecidas. Las estructuras secundarias de estas dos proteínas están muy conservadas, en particular la estructura de los sitios antigénicos II y IV, que son muy importantes en la inducción de Acs neutralizantes (ver más adelante) (McLellan *et al.*, 2013b).

En nuestro laboratorio también se ha resuelto la estructura atómica del ectodominio de la proteína F del hMPV en la conformación pre-fusión (Battles *et al.*, 2017). Para ello, el ectodominio de la proteína se expresó fusionado al dominio “foldon” como se indicó anteriormente, pero además se introdujo el cambio A185P. La Pro introducida se localiza en el loop que conecta las α -hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$ de la

región HRA en la estructura equivalente de la proteína F del hRSV y bloquea así el replegamiento de esas α -hélices necesario para que la proteína adquiriera su conformación post-fusión. La estructura atómica de la proteína F pre-fusión del hMPV se muestra en la figura 9. Esta proteína, al igual que la del hRSV (McLellan *et al.*, 2013a), tiene forma de seta, con una cabeza globular grande y un tallo pequeño formado por α -hélices superenrolladas de las HRB de los tres protómeros.

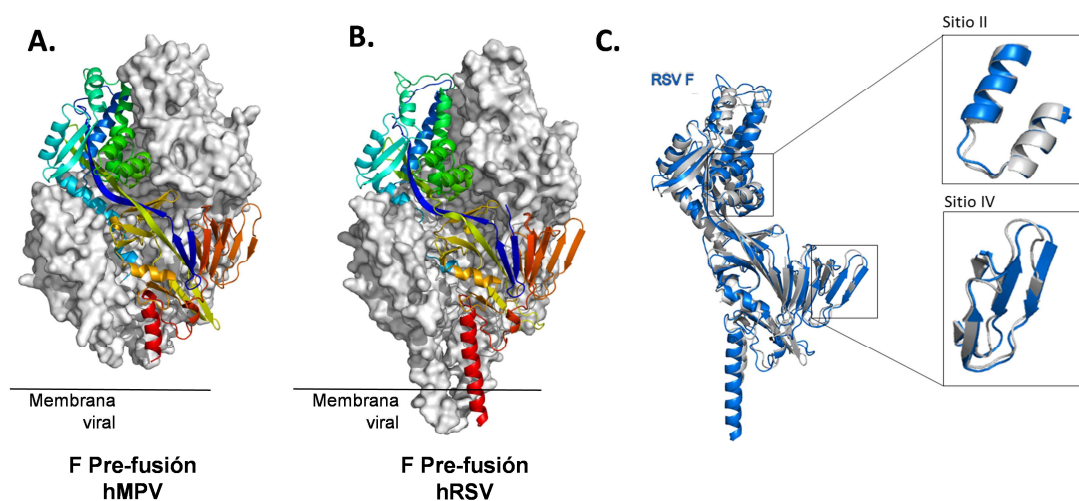


Figura 9. Estructuras de las proteínas F del hMPV (A) y del hRSV (B) en su conformación pre-fusión y comparación entre ellas (C). La parte izquierda de los paneles A y B muestran trímeros de las proteínas F pre-fusión del hMPV y hRSV respectivamente. Uno de los protómeros se muestra en estructura secundaria coloreada en modo arco iris y los otros dos protómeros se muestran como superficies moleculares coloreados en gris.. El panel C muestra la superposición de un protómero de la proteína F pre-fusión del hMPV (blanco) y del hRSV (azul). Los sitios antigénicos II y IV, de relevancia en la inducción de anticuerpos neutralizantes están ampliados.

Si se comparan las estructuras secundarias de los monómeros de la proteína F en las conformaciones pre- y post-fusión del hMPV (Figura 10), se observa que la mayoría de las estructuras secundarias son compartidas entre ambas conformaciones. Tan solo en las regiones N- y C- terminal, donde se localizan las regiones HRA y HRB de la subunidad F1 (coloreados en azul celeste en las estructuras de la Figura 10, cuyos aminoácidos están en gris sobre la secuencia de aminoácidos), existen diferencias significativas en las estructuras secundarias entre ambas conformaciones, observándose un alargamiento en la forma post-fusión de las α -hélices que las componen. Además, hay una reorientación de la HRB en la forma post-fusión de la proteína para acercarla a la HRA y formar así el haz 6-HB.

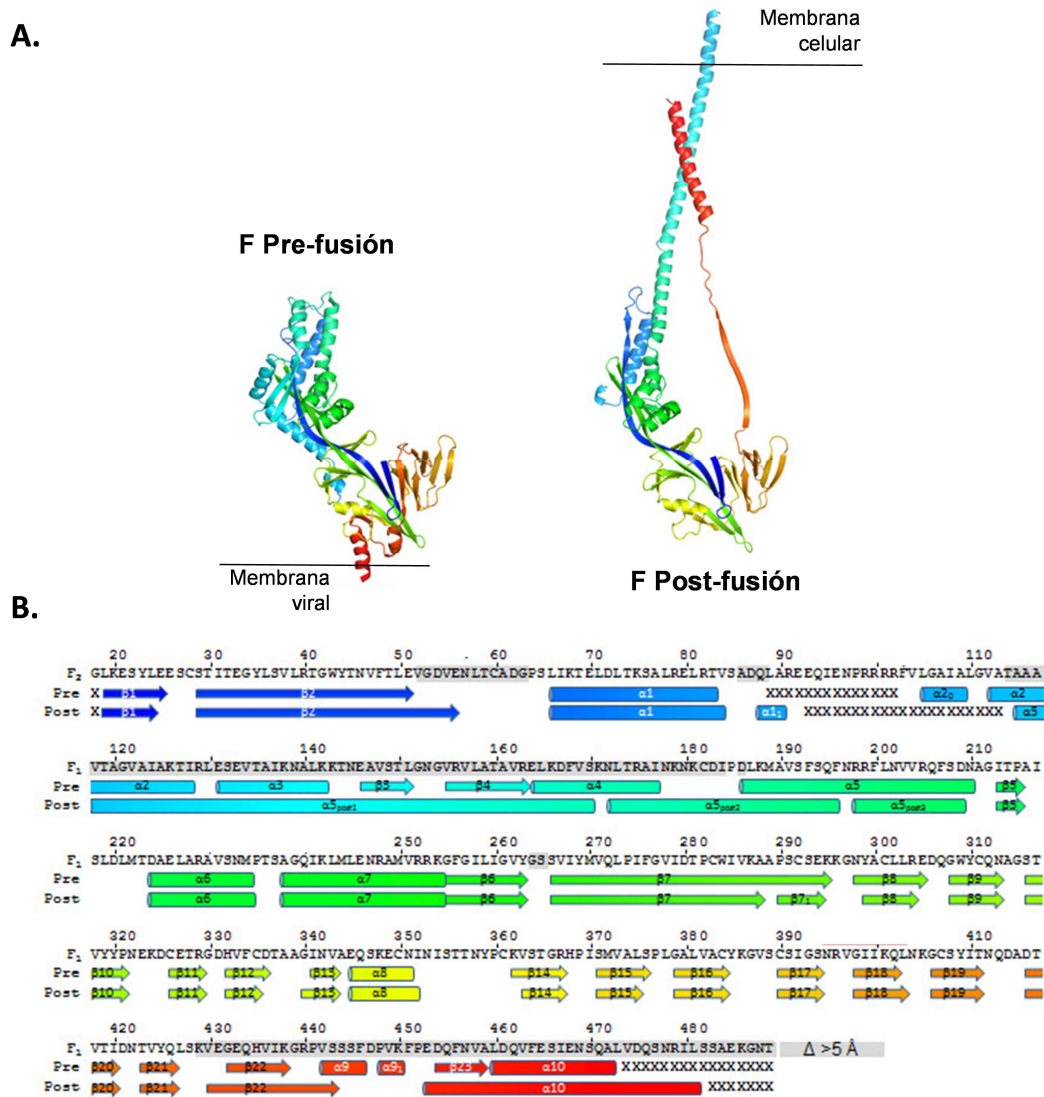


Figura 10. Reordenamiento estructural de la proteína F del hMPV. A. Estructuras secundarias de uno de los protómeros de la proteína F del hMPV en las conformaciones pre-fusión (izquierda) y post-fusión (derecha) coloreados en modo arco iris. **B.** Secuencia de aminoácidos de la proteína F del hMPV y comparación de las estructuras secundarias presentes en las conformaciones pre- y post-fusión. Los cilindros representan α -hélices y las flechas láminas β . Los residuos desordenados o que no se han resuelto bien en la estructura aparecen señalados por una "X". Los residuos localizados a una distancia mayor de 5 Å entre las conformaciones pre- y post-fusión se muestran sombreados.

Ulbrandt y col. fueron los primeros en obtener un panel de hibridomas productores de AcMs neutralizantes frente a la proteína F del hMPV (Ulbrandt *et al.*, 2006). Algunos de estos AcMs protegieron a hamsters frente a un desafío con virus infeccioso cuando se administraron pasivamente. Los epítomos que reconocían esos AcMs se mapearon en la estructura primaria de la de la proteína F mediante el aislamiento y secuenciación de mutantes resistentes a dichos AcMs (Ulbrandt *et al.*, 2008). La Figura 11 muestra esquemáticamente los sitios antigénicos identificados por esos AcMs en la estructura primaria de la proteína F del hMPV, en comparación con los sitios antigénicos identificados en la proteína F del hRSV.

Sitio antigénico

Aa no.

N SP F2 FP HRA F1 HRB TM C

18 102 127 132 152 169 179 238-245 386 397 445 489 514

Aa no.

22 109 137 157 199 262-276 389 429-447 488 516 550

Sitio antigénico

V Ø II III I IV

hRSV

Los sitios antigénicos 4 y 5&6 de la proteína F del hMPV se localizan en regiones equivalentes a los sitios antigénicos II y IV de la proteína F del hRSV (Arbiza *et al.*, 1992; Beeler and Van Wyke, 1989; Lopez *et al.*, 1998). Estos dos sitios antigénicos están presentes tanto en la conformación pre-fusión como en la post-fusión de estas proteínas, como ya se ha indicado anteriormente. También existen equivalencias en los sitios antigénicos 2 y 3 de la proteína F del hMPV con los sitios antigénicos V y Ø de la proteína F del hRSV, respectivamente. Los AcMs que se unen a los sitios antigénicos V y Ø de la proteína F del hRSV son los más potentes en ensayos de neutralización y son anticuerpos específicos de la conformación pre-fusión de la proteína F del hRSV (Gilman *et al.*, 2016b; McLellan *et al.*, 2013c). Aunque no está demostrado formalmente, se postula que los anticuerpos neutralizantes dirigidos frente a la proteína F se unen a la forma pre-

fusión de la proteína y bloquean el inicio de los cambios conformacionales necesarios para la fusión de membranas (Magro *et al.*, 2010).

Para mayor facilidad en la comparación de los sitios antigénicos entre las proteínas F del hRSV y del hMPV, se va a emplear para ambas la nomenclatura utilizada para la proteína F del hRSV. Así los sitios antigénicos 2, 3, 4 y 5&6 de la proteína F del hMPV se denominarán en adelante sitios antigénicos V, Ø, II y IV, respectivamente.

Se han aislado esporádicamente AcMs capaces tanto de reconocer a las proteínas F del hMPV y hRSV, como de neutralizar la infectividad de ambos virus. El AcM humano 54G10, aislado por su capacidad de neutralizar la infectividad de los 4 sublinajes del hMPV, neutraliza también la infectividad del hRSV y tiene eficacia profiláctica y terapéutica en ratones DBA/2 infectados por hRSV (Schuster *et al.*, 2014). Otro AcM, el MPE8, también muestra neutralización cruzada no solo frente al hMPV y al hRSV, sino también frente a otros dos orthopneumovirus como son el virus respiratorio sincitial bovino (bRSV) y el virus de la neumonía del ratón (MPV) (Corti *et al.*, 2013). Por último, el AcM 101F también es capaz de unirse al sitio antigénico IV de las proteínas F de ambos virus (aunque se une 5-10 veces mejor a la proteína F del hRSV) y neutraliza la infectividad tanto del hRSV como del hMPV (Mas *et al.*, 2016). Sin embargo, en una respuesta policlonal, los anticuerpos inducidos tras la inmunización con la proteína F del hMPV no son capaces de unirse a la proteína F del hRSV (o lo hacen muy débilmente) ni de neutralizar la infectividad del hRSV, y viceversa (Mas *et al.*, 2016).

9.4. Inmunogenicidad de la proteína F del hMPV

Como se ha comentado anteriormente, la proteína F es el único antígeno viral capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y protectores frente al hMPV (Biacchesi *et al.*, 2005; Mok *et al.*, 2008; Skiadopoulos *et al.*, 2006; Skiadopoulos *et al.*, 2004a; Tang *et al.*, 2003). Por el contrario, los anticuerpos inducidos por la proteína G del hMPV no son neutralizantes ni protectores (Levy *et al.*, 2013; Ryder *et al.*, 2010). Esto es una diferencia importante con el hRSV, donde la proteína G es capaz de inducir una respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes y protectores frente al hRSV, aunque con títulos menores que los obtenidos con la proteína F.

La inmunización de diversos modelos animales con la proteína F del hMPV, tanto purificada como incorporada a vectores virales, genera una respuesta policlonal de anticuerpos capaz de proteger frente a infecciones con los 4 sublinajes del virus. Así, Skiadopoulos y col. inmunizaron ratones con un virus recombinante del virus de la parainfluenza humana tipo 1, que llevaba como gen adicional el gen de la proteína F del hMPV, y se generaron anticuerpos que neutralizaron a virus de ambos linajes y protegieron a los animales frente a un desafío con cualquiera de los dos linajes del hMPV (Skiadopoulos *et al.*, 2004a). Otros estudios también han demostrado la capacidad de la proteína F del hMPV para inducir una respuesta inmune protectora frente al hMPV en “cotton rats” (Cseke *et al.*, 2007), hamsters (Herfst *et al.*, 2007), ratones (Aerts *et al.*, 2015) y macacos (Herfst *et al.*, 2008b).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la inmunización de ratones con el ectodominio de proteínas F post-fusión de los sublinajes A1 y B1 del hMPV, induce altos niveles de anticuerpos neutralizantes tanto frente a virus del sublinaje homólogo como del heterólogo (Mas *et al.*, 2016). Algo similar ocurre con el hRSV, donde la infección con un virus del subgrupo A o B induce una respuesta de anticuerpos específica tanto para el virus del mismo grupo como del otro grupo antigénico (Collins PL *et al.*, 2013). Sin embargo, los sueros de ratones inmunizados con la proteína F del hMPV no tienen reactividad cruzada (o fue muy débil) frente a la proteína F del hRSV ni neutralizan la infectividad del hRSV y viceversa (Mas *et al.*, 2016).

En el caso del hRSV se ha demostrado que la mayor parte de los Acs neutralizantes están dirigidos frente a epítopos localizados exclusivamente en la forma pre-fusión de la proteína F (Magro *et al.*, 2012). Esta predominancia de los Acs neutralizantes exclusivos de la forma pre-fusión se ha comprobado tanto en sueros individuales de humanos con elevados títulos de anticuerpos neutralizantes frente al hRSV (Ngwuta *et al.*, 2015), como en el análisis de un panel de 364 AcMs procedentes de linfocitos B de tres donantes adultos sanos (Gilman *et al.*, 2016a). También se ha demostrado que los Acms neutralizantes más potentes van dirigidos mayoritariamente frente al sitio antigénico Ø, aunque también frente al sitio antigénico V, presentes solamente en la conformación pre-fusión de la proteína F del hRSV (Gilman *et al.*, 2016a; McLellan *et al.*, 2013b). En modelos animales se ha visto que la inmunización con la forma pre-fusión de la proteína F del hRSV induce títulos de Acms neutralizantes sustancialmente más elevados que

los obtenidos con la forma post-fusión de la proteína (Krarup *et al.*, 2015;Palomo *et al.*, 2016).

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la proteína F del hRSV, las propiedades inmunogénicas de las conformaciones pre- y post-fusión de la proteína F del hMPV son muy similares (Battles *et al.*, 2017). Los anticuerpos presentes en sueros de ratones inmunizados con las dos conformaciones de la proteína, así como en preparaciones de inmunoglobulinas humanas con elevados títulos de anticuerpos neutralizantes frente al hMPV, reconocen de manera similar a ambas conformaciones pre- y post-fusión de la proteína, y neutralizan de igual manera la infectividad del hMPV en ensayos de neutralización. Estas diferencias inmunogénicas inesperadas entre la proteína F del hMPV y del hRSV pueden deberse a las diferencias en el número y la disposición de los sitios de glicosilación de sus respectivas proteínas F (Battles *et al.*, 2017).

10. Tratamiento y prevención

No existe un tratamiento específico frente a la infección por el hMPV. La mayoría de los niños infectados con el hMPV no necesitan ingreso hospitalario. Aquellos que cursan un desarrollo grave de la enfermedad y son hospitalizados se les trata con cuidados paliativos tales como la extracción mecánica de las secreciones, la administración de oxígeno humidificado y de fluidos intravenosos y, en los casos más graves, ventilación mecánica.

10.1. Antivirales

Uno de los problemas más importantes para el uso terapéutico de antivirales frente al hMPV es la estrecha ventana de intervención. Se estima que la infección ocurre tan solo ~4 días antes de la aparición de los síntomas respiratorios. Sin embargo, en el caso del hRSV se ha visto que la reducción de la carga viral por tratamiento con antivirales tiene un efecto beneficioso, reduciendo los días de hospitalización.

La ribavirina, un análogo de nucleósido utilizado en el tratamiento de la hepatitis C y de otros virus, ha mostrado eficacia frente a una infección por hMPV *in vitro* (Wyde *et al.*, 2003) y en ratones BALB/c (Hamelin *et al.*, 2006). Pero el tratamiento con ribavirina es caro y causa muchos efectos secundarios como anemias hemolíticas. Además es potencialmente teratogénico (Soota and Maliakkal, 2014). Otro antiviral en estudio es el NMSO₃, un sialyl lípido sulfatado

que ha mostrado eficacia antiviral frente al hMPV y al hRSV *in vitro* (Wyde *et al.*, 2004) y en ratones BALB/c (Spetch *et al.*, 2008a). Este compuesto inhibe la unión del virus a la célula diana, y mutantes resistentes a este compuesto tienen mutaciones en la proteína G (Spetch *et al.*, 2008b).

Como se ha visto para otras glicoproteínas de fusión tipo I, péptidos derivados de las regiones HRA o HRB de la proteína F del hRSV (Lambert *et al.*, 1996) o de la proteína F del hMPV (Deffrasnes *et al.*, 2008b) son capaces de neutralizar la infectividad del virus *in vitro* e inducir protección en modelos animales. También se ha publicado que RNAs interferentes (siRNAs) dirigidos frente a varios genes virales del hRSV y hMPV interfieren en la replicación del virus *in vitro* y en modelos animales tiene una protección moderada (Deffrasnes *et al.*, 2008a; Zhang *et al.*, 2005).

En resumen, hay una serie de compuestos y productos biológicos en estudio como posibles agentes antivirales frente al hMPV, pero todos ellos están en fases muy tempranas de desarrollo.

10.2. Inmunopprofilaxis con anticuerpos

En la actualidad no hay tratamiento inmunopprofiláctico frente al hMPV. En infecciones por el hRSV, la inmunopprofilaxis sistémica con Acs neutralizantes proporciona una protección sustancial frente a infecciones graves en niños de alto riesgo (Mejias and Ramilo, 2008; Wu *et al.*, 2007a). El primer producto para uso humano que se patentó en 1996 frente a una infección por el hRSV fue el RespigamTM (MedImmune). Consistía en una preparación de inmunoglobulinas humanas purificadas a partir del plasma de donantes con elevados títulos de anticuerpos neutralizantes frente al hRSV. En 2004 el uso de RespigamTM se reemplazó por el AcM Palivizumab, cuyo nombre comercial es SynagisTM (MedImmune). Palivizumab es un anticuerpo monoclonal (AcM) murino humanizado dirigido frente a la proteína F del hRSV y con capacidad de neutralizar su infectividad mejor que Respigam (Beeler *et al.*, 1989). Se utiliza profilácticamente en niños con alto riesgo de infección grave por hRSV como niños prematuros o con enfermedades cardiopulmonares como la enfermedad del corazón cianótico, donde la administración de Respigam estaba contraindicada. Posteriormente el Palivizumab se modificó para incrementar su afinidad y se patentó como Motavizumab (Mz). El Mz es 20 veces más neutralizante que Palivizumab, pero debido a reacciones adversas de hipersensibilidad en ensayos

clínicos, la FDA declinó en 2010 su aprobación para la terapia antiviral. Actualmente no hay ningún AcM equivalente al Palivizumab para la prevención de infecciones por el hMPV.

10.3. Vacunas pediátricas

En la actualidad no se dispone de ninguna vacuna para prevenir la infección por el hMPV ni por el hRSV. Como estos virus infectan a niños de muy corta edad, la vacunación debería iniciarse en las primeras semanas de vida. Además, debido a la reducida respuesta inmune en recién nacidos, probablemente se necesitarían varias dosis de la vacuna a los 2, 4 y 6 meses de edad.

El desarrollo de vacunas pediátricas, sobre todo frente al hRSV, se ha visto complicada por la experiencia de un ensayo clínico con una vacuna basada en virus inactivado con formalina, realizada en niños en la década de los '60. La vacuna no protegió frente a una infección natural por el hRSV y además exacerbó la patología asociada a la infección natural. Así el 80% de los niños vacunados requirieron hospitalización y hubo dos fallecimientos asociados a la vacuna. Posteriormente se averiguó que la falta de protección conferida por esa vacuna se debía a la inducción de bajos títulos de anticuerpos neutralizantes. Además, la exacerbación de la sintomatología asociada a la infección por hRSV en los pacientes vacunados se debió, al menos en parte, a que los anticuerpos no neutralizantes formaban inmunocomplejos que se depositaban en las vías respiratorias produciendo daños pulmonares en los pacientes (Delgado *et al.*, 2009; Murphy and Walsh, 1988). Además, la vacuna de virus inactivado inducía una respuesta celular tipo Th2 que predispone a una respuesta inflamatoria exacerbada (Graham *et al.*, 1993). Algo parecido ha ocurrido con vacunas basadas en el virus de hMPV inactivado con formalina cuando se han probado en modelos animales. En “cotton rats”, la vacuna de hMPV inactivado con formalina produjo daños pulmonares tales como alveolitis y pneumonitis intersticial tras un desafío con hMPV (Yim *et al.*, 2007). Además en macacos produjo bronquitis eosinofílica y bronquiolitis (de Swart *et al.*, 2007). Otra vacuna basada en el virus del hMPV inactivado por calor también produjo daños pulmonares en ratones BALB/c (Hamelin *et al.*, 2007).

Por tanto, se están desarrollando vacunas frente al hMPV basadas en virus atenuados, obtenidos por técnicas de genética reversa y que se han probado en hamsters, monos verdes africanos y ratones, obteniéndose diversos grados de

protección frente a una posterior infección por el hMPV (Biacchesi *et al.*, 2005; Biacchesi *et al.*, 2004; Buchholz *et al.*, 2006). Hasta la fecha, este tipo de vacunas en el hMPV no parecen provocar una exacerbación de la enfermedad ni en modelos animales ni en ensayos clínicos realizados (Wright *et al.*, 2007).

Por último, otro tipo de vacunas en desarrollo frente al hMPV y al hRSV está basada en el uso de la proteína F, bien administrada como vacuna de subunidad o incorporada a algún vector que se pueda utilizar para la vacunación en humanos.

10.4. Vacunas quiméricas

En la actualidad también se están buscando antígenos capaces de inducir una respuesta de anticuerpos neutralizantes y protectores frente a dos o más patógenos. Se han llevado a cabo vacunas basadas en un virus quimérico de la parainfluenza tipo 3 (PIV3) bovina/humana, que expresaba las proteínas F y hemaglutinin-neuroaminidasa (HN) del hPIV3 y la proteína F del hMPV, y que indujo protección en hámster (Tang *et al.*, 2005) y en monos verdes africanos (Tang *et al.*, 2004). En otros virus, como en el HIV-1, se están diseñando antígenos quiméricos basados en la proteína *Env*, que portan epítomos de distintas variantes antigénicas del virus para generar una respuesta inmune capaz de neutralizar un número elevado de cepas circulantes del HIV-1 (Kwong *et al.*, 2013). La aproximación al desarrollo de vacunas universales basadas en la modificación de un antígeno para que contenga epítomos de otras cepas también se está desarrollando en otros patógenos no víricos, como en *Neisseria meningitidis*, donde distintas proteínas quiméricas del factor de unión H, incorporan epítomos de cepas de *N. meningitidis* poco relacionadas entre sí (Scarselli *et al.*, 2011).

Esta aproximación de vacunas basadas en proteínas F quiméricas del hMPV y del hRSV ha sido uno de los temas principales desarrollados en esta Tesis.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Como se ha mencionado en la introducción, no se dispone en la actualidad de ninguna vacuna segura y eficaz frente a infecciones por el hMPV y por el hRSV. Además, la glicoproteína F del hMPV es el único antígeno viral capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes que confieren protección frente a una infección por el virus en modelos animales. La resolución recientemente de las estructuras de la proteína F del hMPV en sus conformaciones pre- y post-fusión ha permitido constatar la semejanza estructural entre las proteínas F del hMPV y hRSV.

Por todo ello, nos planteamos la posibilidad de desarrollar proteínas F quiméricas que portasen, en la misma proteína, sitios antigénicos del hMPV y del hRSV y que permitiesen inducir una respuesta de anticuerpos capaz de neutralizar la infectividad de los dos virus.

Por ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- Obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al dominio 6-HB que permitan identificar la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV.
- Obtención de AcMs neutralizantes y localización de sus epítomos en la proteína F del hMPV que nos permitan ampliar nuestro conocimiento sobre la arquitectura antigénica de esta proteína.
- Diseño de proteínas F quiméricas donde ciertos sitios antigénicos de un virus sean reemplazados por los sitios antigénicos equivalentes del otro virus.
- Caracterización antigénica de las proteínas quiméricas con AcMs específicos de la proteína F de cada virus, para confirmar que las proteínas quiméricas adquieren los cambios antigénicos predichos.
- Comparación de la respuesta de anticuerpos inducida en ratones por distintas proteínas F quiméricas respecto a la inducida por las proteínas F del hMPV y hRSV.

- Evaluación de la capacidad de las proteínas F quiméricas para inducir anticuerpos neutralizantes y protectores frente al virus que se utilizó para realizar el reemplazamiento del sitio antigénico en la proteína quimérica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Líneas celulares

- Vero-118: Clon de células Vero seleccionadas por tener mayor resistencia a la tripsina. La línea celular original proviene de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). American Type Culture Collection, ATCC: CCL-81.
- CV-1: Células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). American Type Culture Collection, ATCC: CCL-70.
- HEp-2: Células de carcinoma de laringe humano. American Type Culture Collection, ATCC: CCL-23.
- Sp2/0-Ag14: Abreviadamente, Sp2/0. Células de mieloma provenientes de ratones BALB/c (*Mus musculus*) American Type Culture Collection, ATCC: CRL-1581.
- Hibridomas productores de anticuerpos monoclonales generados en el laboratorio.

1.2. Virus

- Metapneumovirus humano (hMPV) recombinantes que expresan la proteína “Green Fluorescence Protein” (GFP) derivados de las cepas NL/1/00 y NL/1/99 (sublinajes A1 y B1 respectivamente del hMPV) (Herfst et al., 2004). Cedidos por el Dr. Ron A. Fouchier (Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holanda).
- Virus Respiratorio Sincitial Humano (hRSV) recombinante que expresa la proteína “Green Fluorescence Protein” (GFP) derivado de la cepa A2. Cedido por el Dr. Mark Peeples (Nationwide Children’s, Columbus, Ohio, USA).
- Virus Respiratorio Sincitial Humano (cepa A2) purificado por gradiente discontinuo de sacarosa (30-45%). El stock empleado en el trabajo, con un título de $1,5 \times 10^9$ unidades formadoras de placas (pfu)/ml, fue proporcionado por el Dr. Isidoro Martínez (Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, España).

- vRB12: virus vaccinia mutado, derivado de la cepa Western Reverse (WR) en el que el 93% de la secuencia que codifica para la proteína P37 está deletionada (Blasco and Moss, 1995), cedido por el Dr. Rafael Blasco (INIA, Madrid, España).
- vv_Furina: virus vaccinia recombinante que expresa la proteasa furina (Vey *et al.*, 1994). Cedido por el Dr. Manuel Ramos Álvarez-Buylla (Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, España).
- Virus vaccinia recombinantes disponibles en el laboratorio y utilizados en esta Tesis:
 - vv_115-BV: virus vaccinia que expresa el ectodominio (residuos 1-489) de la proteína F del hMPV sublinaje A1 en su conformación pre-fusión (Battles *et al.*, 2017).
 - vv_F/Tm Δ 103-111_KRKRR_TEV_Xa-Foldon-6His_A1: virus vaccinia que expresa el ectodominio (residuos 1-489) de la proteína F del hMPV sublinaje A1 en su conformación post-fusión (Mas *et al.*, 2016).
 - vv_F/Tm Δ DsCav-1: virus vaccinia que expresa el ectodominio (residuos 1-524) de la proteína F del hRSV cepa Long en su conformación pre-fusión (McLellan *et al.*, 2013a).
 - vv_F/Tm Δ 137-146_TEV_Xa-Foldon-6His: virus vaccinia que expresa el ectodominio (residuos 1-524) de la proteína F del hRSV cepa Long en su conformación post-fusión (Mas *et al.*, 2016).

1.3. Bacterias y plásmidos

- Bacterias XL 10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies). Células utilizadas para el clonaje y amplificación de plásmidos empleados en este trabajo.
- Bacterias E. coli BL21 Competent Cells (Agilent Technologies). Bacterias utilizadas para la expresión de las proteínas fusionadas a Glutathione S-Transferasa (GST).
- Plásmido pRB21: Utilizado para el clonaje y modificación del gen de las proteínas F del hRSV y del hMPV y obtención de virus vaccinia, cedido por el Dr. Rafael Blasco (INIA, Madrid, España).

1.4. Animales

Se emplearon ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas suministradas por el servicio del animalario del Centro Nacional de Microbiología y por la empresa Envigo.

1.5. Anticuerpos

- Los AcMs dirigidos frente a la proteína F del hRSV: 107F, 114F, 116F, 117F y 47F se purificaron a partir del sobrenadante de cultivos de los hibridomas correspondientes. El AcM 101F se obtuvo a partir de células 293K transfectadas con plásmidos pCAGGs que codificaban la cadena pesada y ligera de ese AcM.
- Los AcMs D25, 5C4, 14402, MPE8, 11569 y AM22, específicos de la proteína F del hRSV se obtuvieron en células 293K transfectadas con plásmidos pCAGG que codificaban la cadena pesada y ligera de cada AcM, cedidos por el Dr. Jason McLellan (Departamento de Bioquímica y Biología Celular, Geisel School of Medicine, Hanover, EEUU).
- Cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al hRSV 021/1G, 021/2G, 47F y 67P para revelar el plaqueo de hRSV.
- Anticuerpos comerciales: anti-mouse y anti-human_IgG horseradish peroxidase (GE Healdcare), anti-Histidine (anti-His, Bio-Rad).
- Los AcMs obtenidos frente a la proteína F del hMPV están descritos en el Apartado 1 de Resultados.

1.6. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis de la proteína F del hMPV (sublinaje A1), así como los oligonucleótidos utilizados para la obtención de proteínas F quiméricas y para la secuenciación de la proteína F del hMPV se detallan en la Tabla 2.

MUTAGÉNESIS	Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
	A1_A238E	GTTTCCAACATGCCAACATCTGAAGGACAAATAAACTGATGT TG
	A1_K242N	CCAACATCTGCAGGACAAATAAATCTGATGTTGGAGAACCGT GCA
	A1_K386E	GGGGCTTTGGTTGCTTGCTACGAGGGAGTGAGCTGTTCCATT GGC
	A1_V397F	TGTTCCATTGGCAGCAACAGATTCGGGATCATCAAGCAACTG AAC
	A1_K401T	AGCAATTGGGTTGGAATCATCACACAATTACCCAAAGGCTGC TCA
	P400+	AATGATATGCCTATAACAGCTGGACAGATAAAAGTTAATGTTGG AGAATGTTCAAATAGTTAGACAGCAAAGTTACTCTATC
	P400-	CTCCAACATTAACCTTTATCTGTCCAGCTGTTATAGGCATATCA TTGATTAATG
	P401+	TTAATCAATGATATGCCTACATCAGCTGGACAGATAAAAGTTAA TGTTGGAGAATGTTCAAATAGTTAGACAGCAAAGTTACTCTAT C
	P401-	CTCCAACATTAACCTTTATCTGTCCAGCTGATGTAGGCATATCA TTGATTAATGACAATAA
	P403+	ACAGCATCCAATAAAAAATGTTGGAATCATAAAGCAATTGAATA AAGGGTGTGATTATGTATCAAATAAAGGGGTGGACACT
	P403-	TTTATTCAATTGCTTTATGATTCCAACATTTTTATTGGATGCTG TACATTTAG
	P404+	TATGGCAAAACTAAATGTTCAATAGGCAGTAACAGAGTTGGAA TCATAAAGCAATTGAATAAA
	P404-	TCTGTTACTGCCTATTGAACATTTAGTTTTGCCATAGCATGAC AC
	P405+	GCCATTGTGTCATGCTATAAGGGAGTTAGCTGTTCAATAGGC AGTAACAGAGTTGGA
	P405-	GCTAACTCCCTTATAGCATGACACAATGGCTCCTAGAGA TCCAACATGCCAACATCTAACGACCAGAAAAAACTGATGAGC
	P414+	AACAACCGTGCAATGGTAAGAAGAAAAGGGTTCGGAATC GTTGCTCATCAGTTTTTTCTGGTCGTTAGATGTTGGCATGTTG
	P414-	GAAACAGCTCT GCTGTTTCCAACATGCCAATAACTAACGACCAGAAAAAACTGA
	P415+	TGAGCAACAACCGTGCAATGGTAAGAAGAAAAGGGTTCGGAA TC
	P415-	GTTGCTCATCAGTTTTTTCTGGTCGTTAGTTATTGGCATGTTG GAAACAGCTCTGGCTAG
	P416+	ATGACAGATGCTGAACTACTCAGCCTTATTAACGACATGCCAA TAACTAACGACCAGAAAAAACTGATGAGC
	P416-	GTCGTTAATAAGGCTGAGTAGTTCAGCATCTGTCATTAAGTCC AA

	P417+	TCCATTGGCAGCAACAGACGAGGGATCATCAAGACATTTCAGC AACGGCTGCTCTTATATAACCAACCAAGACGCAGACACA
	P417-	GTTGCTGAATGTCTTGATGATCCCTCGTCTGTTGCTGCCAAT GGAACAGCTCAC
SECUENCIACIÓN	A1_EcoRi_1-15+	CGCGAATTCGGGATGTCTTGAAAAGTG
	A1_575-593+	GCTTCAGTCAATTCAACAG
	A1_950-967	CTGTTTACTACCCAAATG
	A1_1232-1252-	CTGTGTCTGCGTCTTGTTGG
	A1_829-850-	AGCAAGGCGTGTCTATAACCCC
	A1_1564-1588-	CACCACTCAGCTCTGGAGGTGCTCC
	B1_34-58+	CTCATAACACCCCAGCACGGGCTAA
	B1_567-592+	GGCTGTCAGCTTCAGTCAATTCAACA
	B1_1004-1028+	GTGACACAGCAGCAGGGATCAATGT
	B1_454-477-	GGCTAGGACCCGCACACCATTCCC
	B1_898-924-	CCCTTGATCCTCTCTTAGGAGGCAAGC
	B1_1315-1337-	AAACTGCTTGAACTGGTCTCCC
	B1_1585-1610-	GGTATGAAACCGCGTTGGTGACACC

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo. El signo + indica que el oligonucleótido tiene la polaridad del mRNA del gen F, y el signo – la complementaria

2. Medios de cultivo

2.1. Medios de células eucariotas

- DMEM-10%, DMEM-5%, DMEM-2,5% y DMEM-0%: Medio Eagle modificado por Dulbecco (Lonza), con 4 mM de glutamina (Lonza), 100 U/ml de penicilina (Lonza), 0,1 mg/ml de estreptomicina (Lonza) y enriquecido con 10%, 5%, 2,5% o sin suero de ternera fetal (STF) (Biowest), respectivamente. Este medio se empleó con células CV-1 y HEp-2.
- DMEM-Agar: Medio DMEM (Biological Industries) con 4 mM de glutamina (Lonza), 100 U/ml de penicilina (Lonza), 0,1 mg/ml de estreptomicina (Lonza), enriquecido con 2,5% STF, 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 0,7% de agar noble. Para el plaqueo del hRSV, en vez de agar noble se añadió 0,7% de agarosa “low melting point” (Difco).
- IMDM-10%, IMDM 5% e IMDM-0%: Medio Iscove modificado por Dulbecco con 4 mM de glutamina (Lonza), 100 U/ml de penicilina (Lonza), 0,1 mg/ml de estreptomicina (Lonza) y enriquecido con 10% y 5% o sin suero de ternera fetal (Biowest), respectivamente. Empleado con las células Vero 118.

- ClonaCell™-HY HAT: Abreviado, medio HAT (StemCell). Medio enriquecido con Hipoxantina, Timidina y Aminopterina.
- RPMI-15%: Medio RPMI 1645 (Lonza) suplementado con 4 mM Glutamina, 100 U/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomicina y HT (Media supplement Hibrimax 50X, Sigma) y enriquecido con 15% STF. Empleado para el crecimiento de células Sp2/0.
- ClonaCell™-HY medio E: Abreviado, Clonacell (StemCell). Empleado para el clonaje y crecimiento de hibridomas.
- Optimem: medio enriquecido utilizado para la transfección de células en cultivo, suministrado por Gibco.
- Tripsina-Verseno: 0,05% tripsina (Lonza) y 0,02% EDTA (Merk) en PBS (Lonza), utilizado para despegar las células adherentes.

2.2. Medios para bacterias

- LB: suministrado por Nzytech.
- NZY: 4% bacto-Triptona (BD), 2% extracto de levadura (Difco), 2% NaCl.
- ONE: Overnight Express Instant TB Medium, suministrado por Novagen.
- Circlegrow: medio semisólido suministrado por Q-BIOgene.

3. Manipulación de células y virus

3.1. Cultivo de células eucariotas

Las células HEp-2 y CV-1 se crecieron en placas de Petri de 150mm de diámetro (P150) con medio DMEM-10% y las células Vero-118 con IMDM-10%. Para el cultivo de células Sp2/0 se empleó el medio RPMI-15%. Los hibridomas se crecieron en medio Clonacell. Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 98% de humedad. Las monocapas celulares de HEp-2, CV-1 y Vero-118 se subcultivaron desprendiéndolas con tripsina-verseno. Para las células Sp2/0 y los hibridomas, no se requieren proteasas, desprendiéndolas del plástico por acción mecánica de pipeteos. Para su almacenamiento, las células se

resuspendieron en STF con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) y se congelaron en nitrógeno líquido.

3.2. Cultivo de bacterias

Las bacterias transformadas XL 10-Gold se seleccionaron en medio semisólido Circlegrow con 100 µg/ml de ampicilina y se crecieron en medio LB líquido con 100 µg/ml de ampicilina durante 16-20 horas a 37°C y en agitación. El DNA plasmídico se purificó con el kitQIAEX II Gel Extration (Qiagen).

3.3. Metapneumovirus humano

3.3.1. Crecimiento y titulación de metapneumovirus humano (hMPV)-GFP

Para el crecimiento del hMPV, monocapas confluentes de células Vero-118 en placas de Petri P150 se infectaron con virus hMPV-GFP de los sublinajes A1 o B1 a una multiplicidad de infección (moi) de 0,05 unidades formadoras de foco por célula (uff/célula) en medio IMDM-0%. Después de una hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se añadió medio IMDM-0% fresco. Al día siguiente se retiró la mitad del volumen del medio y se añadió medio IMDM-0% con 4 µg/ml de tripsina disuelta en medio IMDM-0% (concentración final de tripsina 2 µg/ml) y se dejó progresar la infección 3-4 días. Cuando la infección estaba muy extendida, se retiró todo el medio y se añadieron 20 ml/placa de medio IMDM-0% con tripsina 2 µg/ml. Al día siguiente, se rasparon las células en el medio y se mezclaron con un volumen igual de sacarosa al 50% para su almacenamiento en nitrógeno líquido hasta su utilización.

La titulación del hMPV-GFP se llevó a cabo por recuento visual de focos fluorescentes al microscopio de fluorescencia. Para ello, cultivos confluentes de células Vero-118 crecidas en placas de 96 pocillos (5×10^4 células/pocillo) se infectaron por duplicado con 150 µl/pocillo de diluciones seriadas del stock de virus en medio de cultivo IMDM-0%. La infección se dejó progresar 24 h a 37°C y el título de virus se estimó mediante el recuento directo de células fluorescentes en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TS-100 con la unidad Nikon Intensilight C-HGFI. Los títulos obtenidos fueron aproximadamente de 1×10^7 ffu/ml.

3.3.2. Ensayos de neutralización del hMPV-GFP

Para los ensayos de neutralización con los sobrenadantes de los hibridomas, células V-118 confluentes en placas de 96 pocillos Black Clear Bottom se infectaron con 80 μ l/pocillo del virus hMPV_{A1}-GFP (moi de 0,05 ffu/célula). Seguidamente se añadieron 20 μ l/pocillo de los sobrenadantes procedentes de la fusión celular. La infección se dejó progresar 24h a 37°C. Posteriormente se retiró el medio de infección, las células se lavaron con 100 μ l/pocillo de IMDM-0% y se añadieron 100 μ l/pocillo de IMDM-0% con 2 μ g/ml de tripsina y se dejó progresar la infección 48 h a 37°C. Pasado el tiempo de infección se lavaron las células con PBS atemperado y se midió la intensidad de la fluorescencia en el dispositivo Infinite M200Pro (Tecan) con una λ_{ex} de 483nm y una λ_{em} de 535nm.

En los ensayos de neutralización del virus hMPV_{A1}-GFP con anticuerpos monoclonales o sueros policlonales se modificó el ensayo para evitar el uso de tripsina. Para ello, células V-118 se infectaron con 150 μ l/poc de virus hMPV_{A1}-GFP (moi de 0,4 ffu/célula), pre-incubado 30 minutos con diluciones los anticuerpos purificados o de los sueros, en medio IMDM-0% para los AcMs o IMDM-5% para los sueros. La infección se dejó progresar 48h a 37°C sin cambiar el medio. Pasado el tiempo de infección, las células se lavaron con PBS y la señal de fluorescencia de cada pocillo se cuantificó de igual modo a lo explicado en el párrafo superior. Los valores de fluorescencia se expresaron en porcentaje respecto de virus en ausencia de anticuerpo.

3.3.3. Obtención y caracterización de virus hMPV_{A1}-GFP resistentes a AcMs

Se realizaron sucesivos pases del virus hMPV_{A1}-GFP en presencia de cantidades crecientes de AcM, para obtener virus resistentes a esos AcMs. Para ello, en placas de M24, se infectaron células Vero-118 confluentes con el virus hMPV_{A1}-GFP “wild-type”, preincubado durante 30 minutos a temperatura ambiente con 50 veces la IC₅₀ de cada uno de los AcMs. A las 24h de la infección, se retiró el medio y se añadió 2 ml/pocillo de medio IMDM-0% fresco con tripsina 2 μ g/ml. Pasadas 48-72 horas, cuando la mayoría de las células estaban infectadas (siguiendo la infección en el microscopio de fluorescencia), estas se rasparon y se recogieron junto al sobrenadante, homogeneizado por pipeteo, agitación con vortex y un proceso de congelación (-80°C) y descongelación (37°C).

En los pases subsiguientes, para cada AcM se infectaron dos pocillos de M24, uno con virus del pase anterior sin añadir AcM, y otro con el mismo virus y una cantidad del AcM mayor que la del pase anterior. Los virus se consideraron resistentes cuando el número de células infectadas y fluorescentes del pocillo control y del que tenía AcM, era parecido. El número de pases que se necesitó varió entre los distintos anticuerpos pero en todos los casos se dieron entre 5 y 10 pases hasta un último pase en presencia de aproximadamente 200 µg del anticuerpo neutralizante.

Después de obtener los virus resistentes se procedió a la secuenciación del mRNA codificante de la proteína F correspondiente. Para ello, células Vero-118 en placas de M24 se infectaron con cada virus (moi 0,1 ffu/célula). A los tres días, cuando la monocapa estaba totalmente infectada, se rasparon las células y se separaron del sobrenadante centrifugándolas 5 minutos a 1500 rpm. El pellet celular se resuspendió en 0,5 ml de Trizol (Sigma), resuspendiéndolo bien por pipeteos y vortex, y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 100 µl de cloroformo (Sigma) y se agitó durante 15 seg con el vortex hasta conseguir una emulsión que se dejó reposar 3 min y se minifugó a 14.000 rpm, 15 minutos a 4°C. La fase líquida superior, donde se encuentra el RNA, se recogió con cuidado para no recoger nada de la interfase, donde se localizan las proteínas. Esa fase líquida se pasó a otro eppendorf y se precipitó con 250 µl de isopropanol incubándolo durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se minifugó el precipitado a 14.000 rpm durante 10 minutos y a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 0,5 ml de etanol 75% y se minifugó 2 min a 14.000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet que contenía el RNA se secó durante 1h en una estufa a 60°C. Por último, el RNA se resuspendió en 50 µl de agua estéril precalentada a 60°C. La integridad del RNA total extraído se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El RNA se almacenó a -20°C hasta su uso para la síntesis del cDNA y secuenciación.

La síntesis del cDNA se llevó a cabo con el kit AccuScript PfuUltra II RT-PCR (Live Technologies). Para ello se preparó en el termociclador una reacción de RT, agregando 200 ng del RNA, 100 ng del oligonucleótido negativo A1_1564-1588- (ver Tabla 2) y preincubándolo 15 minutos a 65°C. Posteriormente se agregó 1,5 µl de 100 mM DTT y 1 µl del enzima retrotranscriptasa AccuScript High-Fidelity RT, según las especificaciones de uso, y se incubó 30 min a 42°C y 5 min a 95°C en el termociclador. Por último se realizó la amplificación por PCR del cDNA del gen que codifica para la proteína F del hMPV. Para ello se mezcló 1 µl del producto de la reacción anterior,

100ng de los oligonucleótidos positivo (Tabla 2, A1_EcoRi_1-15+) y negativo (A1_1564-1588-) y 0,5 µl de la polimerasa pfuUltra II, todo ello en un volumen final de 50µl de H₂O. La mezcla se sometió a los siguientes ciclos de amplificación: 95°C 2min // 95°C 30seg / 68°C 30seg / 68°C 1min (25 ciclos) // 68°C 5min. El producto de amplificación se analizó en un gel de agarosa al 1%. La secuenciación del gen de la proteína F se llevó a cabo en la unidad de Genómica del Instituto de Salud Carlos III con los oligonucleótidos mostrados en el apartado de secuenciación de la proteína F del hMPV_{A1} de la Tabla 2.

3.4. Virus respiratorio sincitial humano

3.4.1. Crecimiento y titulación del virus respiratorio sincitial humano

Para el crecimiento del hRSV-GFP, monocapas confluentes de células HEp-2 en placas de Petri P150, se infectaron con el virus hRSV-GFP (cepa Long) a una multiplicidad de infección (moi) de 0,05 unidades formadoras de foco por célula (uff/célula) en medio DMEM-0%. Después de dos horas de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se añadió medio DMEM-0% fresco. Tras dejar progresar la infección 3-4 días, se rasparon las células en el sobrenadante de cultivo, haciéndose una suspensión homogénea mediante pipeteo y agitación con vortex. El hRSV-GFP se alicuoteó y se guardó en nitrógeno líquido hasta su uso. Para utilizarlo, después de su descongelación, se minifugó 30 seg a 14.000 rpms para eliminar los restos celulares.

La titulación del hRSV se llevó a cabo por dos métodos distintos. La titulación del virus hRSV-GFP se realizó mediante el recuento visual de células infectadas. Para ello, cultivos confluentes de células V-118, crecidas en placas de 96 pocillos (5x10⁴ células/pocillo), se infectaron por duplicado con 150 µl/pocillo de diluciones seriadas del stock de virus en medio de cultivo DMEM-0%. La infección se dejó progresar 24 h a 37°C y el título de virus se estimó mediante el recuento directo de células fluorescentes en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TS-100 con la unidad Nikon Intensilight C-HGFI. Los títulos obtenidos fueron aproximadamente de 1x10⁷ ffu/ml.

La titulación del hRSV que no tiene el gen de la proteína GFP se llevó a cabo mediante ensayos de plaqueo. Para ello, se sembraron 1,2x10⁶ células HEp-2 en placas M6 con medio DMEM-10%. Al día siguiente, cuando las células formaban una monocapa confluyente, estas se lavaron con 2 ml de medio DMEM-2% y se añadieron diluciones seriadas del virus en 300 µl/pocillo de DMEM-2%. El virus se adsorbió durante 2 h, moviendo la placa cada 10-15 min. Tras la adsorción, se retiró el inóculo y

las células se lavaron con 3 ml/pocillo de DMEM-2,5%. Seguidamente se agregaron 3 ml/pocillo de DMEM-Agar y la infección se dejó progresar 5 días a 37°C y 5% CO₂. Para revelar las placas de lisis producidas por el hRSV, se añadieron 3 ml de formaldehído al 4% en PBS por pocillo y se incubaron 45 min a temperatura ambiente. Seguidamente se eliminó la agarosa, y las células se fijaron con 2 ml/pocillo de metanol a -20°C durante 5 min. Las células fijadas se lavaron tres veces con H₂O, se les añadió 1ml/pocillo de 1% BSA en PBS, y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente se retiró el bloqueante (1% BSA en PBS) y se añadieron 800 µl de una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a las proteínas F, G y P del hRSV (sobrenadantes de los hibridomas 021/1G, 021/2G, 47F y 67P, diluidos 1/50 en 1% BSA). Tras una hora de incubación, se retiró la mezcla de anticuerpos y las células se lavaron tres veces con H₂O. Seguidamente se añadieron 800 µl de Igs de ratón conjugadas con peroxidasa y se incubó una hora a temperatura ambiente. Por último las células se volvieron a lavar tres veces con H₂O y se añadieron 800 µl/pocillo de tampón 0,1M citrato, 0,2 M fosfato pH 5,5, 0,12% de H₂O₂ y 0,16mg de 3-Amino-9-etil-carbazol (AEC) como sustrato, disuelto en DMSO. Esta reacción se incubó durante 20 min en oscuridad y, tras retirar el sustrato, se procedió al recuento visual de las placas de lisis.

3.4.2. Ensayos de neutralización del hRSV-GFP

Para los ensayos de neutralización del virus hRSV-GFP, células V-118 confluentes en placas de 96 pocillos Black Clear Bottom se infectaron con 150 µl/pocillo de virus hRSV-GFP (multiplicidad de infección de 0,05 ffu/célula), pre-incubado 30 minutos con diluciones de los anticuerpos en medio IMDM-0% para los AcMs, o IMDM-5% para diluciones de los sueros. La infección se dejó progresar 72 h a 37°C. La señal de fluorescencia se midió de igual manera que lo explicado en la neutralización del hMPV-GFP.

3.5. Virus Vaccinia

3.5.1. Obtención de virus vaccinia recombinantes

Los virus vaccinia recombinantes empleados en este trabajo se obtuvieron siguiendo el método descrito por Blasco y Moss (Blasco *et al.*, 1995). Este se basa en el uso del virus vRB12, que carece del gen VP37 y por tanto es incapaz de formar placas de lisis. Sin embargo, al infectar células con el virus vRB12 y posteriormente transfectarlas con plásmidos derivados del pRB21, que lleva una copia funcional del

gen *VP37*, se forman virus recombinantes que son capaces de formar placas de lisis y por tanto pueden seleccionarse de esta manera.

Así pues, células CV-1 confluentes crecidas en placas de M6 se infectaron con 1 ml/pocillo del virus vaccinia de la cepa vRB21 a una moi de 1 pfu/célula en DMEM-0%. Tras una hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y se procedió a transfectar con los plásmidos derivados del pRB21. Para ello se preparó una mezcla de 100 µl/transfección en medio Optimem que contenían 30 µl del agente transfectante Lipofectamina-2000 (Live Technologies) y 5 µg del plásmido pRB21 que codificaba el gen de la proteína F a expresar. A las células se les añadió 1 ml/pocillo de medio DMEM-0% y sobre este medio se añadieron los 100 µl de la mezcla de trasfección. La trasfección se dejó progresar 4-6 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo se retiró la mezcla, las células se lavaron con DMEM-0% y se les añadieron 2 ml/pocillo de DMEM-0%, dejando progresar la infección 48h a 37°C.

Seguidamente, los virus presentes en los sobrenadantes de los cultivos se plaquearon en monocapas confluentes de células CV-1 en placas de M6, como se indicará posteriormente. Se seleccionaron 2-3 placas de lisis para cada sobrenadante, que se emplearon para inocular nuevas monocapas de células CV-1. Los virus de estas nuevas infecciones se volvieron a plaquear 2-3 veces para asegurarse de la eliminación de todo el virus vRB12 parental.

Los virus vaccinia recombinantes así obtenidos se crecieron inoculando células CV-1 en placas P150 ($1,3 \times 10^7$ células). La infección se dejó progresar 3 días, hasta que el efecto citopático era generalizado. En ese momento, las células se rasparon y se recogieron junto con el sobrenadante, que se centrifugó 10 minutos a 2.500 rpm a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet celular se lavó con PBS estéril y se resuspendió en 3 ml de 1 mM Na_2HPO_4 por cada P150. Puesto que el 80-90% del virus infectivo es intracelular, para liberar el virus, el pellet celular se sometió a tres ciclos de congelación (-80°C) y descongelación (37°C) de las células y a un ciclo de sonicación en baño de ultrasonidos 5 minutos, para romper las células y liberar el virus. Seguidamente, el extracto sonificado se clarificó de los restos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 2.500 rpm y 4°C y el sobrenadante se recogió y se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.5.2. Titulación de virus vaccinia por plaqueo en agar

Células CV-1 confluentes en pocillos de placas M6 (1×10^6 células/pocillo) se infectaron por duplicado con diluciones seriadas de virus en 1 ml/pocillo de DMEM-2,5%. Después de una hora de adsorción, se retiró el inóculo, se lavaron las células con DMEM-2,5% y se añadieron 2 ml/pocillo de DMEM-agar al 0,7%. Tras 48h a 37°C, las placas de lisis se podían observar visualmente como calvas en la monocapa celular. Entonces se procedió bien a resuspender algunas de las placas de lisis en 150 μ l de medio DMEM-0% por placa de lisis para el posterior crecimiento del virus, o bien a la fijación y tinción de la monocapa para el recuento de las placas de lisis. Para esto último, se añadió sobre el agar 1 ml/pocillo de paraformaldehído (PFA) al 10% en PBS completo y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Tras retirar el PFA y el agar, las células se tiñeron con 1 ml de cristal violeta al 0,1% en metanol al 20% por pocillo, durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron repetidamente con H₂O y las placas se contaron visualmente. Los títulos de virus obtenidos habitualmente fueron de 10^7 - 10^8 pfus/ml en el caso de virus provenientes de una sola placa de lisis o de $\sim 10^9$ pfus/ml cuando los vaccinias se habían crecido a gran escala.

4. Obtención y manejo de anticuerpos monoclonales (AcMs)

4.1. Obtención de hibridomas

La obtención de hibridomas productores de AcMs se basa en la fusión de linfocitos derivados del bazo de ratones con células de la línea de mieloma Sp2/0 (de crecimiento ilimitado en cultivo) y su crecimiento en medio HAT. Este medio tiene aminopterina (inhibidor de la síntesis *de novo* de las purinas), por lo que las células Sp2/0, deficientes en el enzima HGPRT, no son capaces de crecer. Asimismo los esplenocitos no son capaces de crecer normalmente salvo en medios con factores de crecimiento específicos. Sin embargo, las células provenientes de la fusión de una célula Sp2/0 con un linfocito adquieren el gen que codifica para el enzima HGPRT del linfocito y pueden crecer ilimitadamente en medio HAT, mientras que no lo harán las células que no se hayan fusionado. Además, algunas de esas células fusionadas (hibridomas) adquirirán la capacidad de producir anticuerpos deseados si se fusionaron con linfocitos productores de esos anticuerpos.

Por tanto, ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas se inmunizaron por inoculación intramuscular (i.m) con 10 μ g/dosis de proteína F purificada en 75 μ l de buffer 50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl pH 8,0, mezclados con 75 μ l del adyuvante

CpG. Se administraron dos dosis separadas por 4 semanas. Cuatro días después de la última dosis se procedió a realizar la fusión celular. Para ello, el ratón inmunizado se sacrificó con vapores de isofluorano, y seguidamente se extrajo el bazo que se disgregó en RPMI pasándolo por un cedazo. Así se obtuvo una suspensión de esplenocitos. Estas células se mezclaron, en proporción 4:1, con células Sp2/0 que se encontraban en fase logarítmica de crecimiento y la mezcla de células se recogió mediante centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos. Para la fusión celular, el pellet se resuspendió en 1 ml de Polietilenglicol 4000 (PEG-4000, Invitrogene), que se fue añadiendo lentamente y con agitación durante 1 min en un recipiente con agua a 37°C. Finalmente las células se resuspendieron en medio HAT y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos, a razón de 100.000 esplenocitos originales por pocillo en 200 µl de medio HAT y se incubaron 5 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Tras los cinco días de incubación el medio HAT se retiró y se añadieron 200 µl/pocillo de medio Clonacell. Una semana después se recogieron 120 µl del sobrenadante de cada pocillo y la presencia de AcMs se probó en ensayos de ELISA y/o microneutralización. Los hibridomas cuyos sobrenadantes tuvieron AcM de interés se clonaron dos veces por dilución límite, para asegurarse que se había estabilizado su dotación cromosómica y que todas las células provenían de un único clon.

Para su almacenamiento, los hibridomas clonados se crecieron en placas P100. Las células se rasparon y el sobrenadante se descartó centrifugando las células a 2000 rpm a temperatura ambiente. Los hibridomas se congelaron en nitrógeno líquido en presencia de STF con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%.

4.2. Purificación de anticuerpos monoclonales (AcMs)

Los hibridomas se crecieron en placas P100 en medio Clonacell hasta obtener un volumen de sobrenadante de aproximadamente 300 ml. Para precipitar los AcMs presentes en el sobrenadante, éste se mezcló en iguales proporciones con sulfato amónico saturado pH 7,0 durante 2 h en agitación a 4°C. A continuación se centrifugó 50 min a 10.000 rpm, se descartó el sobrenadante y el “pellet” que contenía los anticuerpos se resuspendió en 10 ml de PBS que se dializaron frente a 2 litros de PBS durante 24h. Para purificar los AcMs, la disolución en PBS se mezcló en proporción 1:1 con tampón 1,5 M Glicina, 3 M NaCl, pH 8,9 y se pasó por una columna de proteína A-Sepharosa, equilibrada en el mismo tampón. Los AcMs unidos a la columna se eluyeron con tampón 0,1M citrato sódico pH 3,0. El pH de las fracciones eluidas se neutralizó con Tris saturado y tras juntarse aquellas fracciones que tenían una

absorbancia significativa a 280 nm, se dializaron frente a PBS durante 24 h. El rendimiento medio de este método fue de 8-10 mg de AcM por cada 300 ml de sobrenadante.

4.3. Marcaje de los AcMs con biotina

Quinientos microgramos de cada AcMs se dializaron frente a un tampón de 0,1 M Na_2CO_3 , 0,5 M NaCl pH 9,0 durante 24 h. Posteriormente se añadió biotina (disuelta el mismo día de su uso a 1 mg/ml en DMSO) en proporción 1:10 (v:v) y se incubó 2 horas en agitación. Por último se volvió a dializar 24 h frente a PBS y su correcta biotinilación se evaluó en ensayos de ELISA.

4.4. Obtención y purificación de fragmentos Fab

Dos miligramos de cada uno de los AcMs purificados se digirieron con papaína en un volumen final de 2 ml en PBS incompleto, que contenía 100 μg de papaína en presencia del agente reductor cisteína (concentración final 4,2 mM) y EDTA (concentración final 0,8 mM). Tras una incubación de 4h a 37°C, la digestión se paró con Iodoacetamida a una concentración final de 30 mM durante 15 min y a temperatura ambiente.

Una vez digeridos los AcMs, el material se pasó por una columna de afinidad con anticuerpos anti-kappa (Thermo Scientific) equilibrada en PBS. La columna se lavó hasta que la $\text{OD}_{280\text{nm}}$ de eluido fue $<0,1$. Seguidamente, los fragmentos Fab retenidos en la columna se eluyeron con 0,1 M citrato sódico pH 3,0 y las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente con Tris saturado. Las fracciones que contenían el Fab se juntaron y se concentraron hasta un volumen de 450 μl con un VivaSpin 30 (30 kDa). A continuación se cargaron en una columna de filtración en gel Superdex 200 10/300 GL, previamente equilibrada en PBS, para separar la papaína del Fab. El pico del Fab eluyó alrededor del ml 90, y sus fracciones se concentraron mediante un VivaSpin 30. De los 2 mg de AcM de partida se recuperó entre 0,1-0,5 mg de Fab. La reactividad de los fragmentos Fab obtenidos se analizó mediante ELISA.

5. Mutagénesis de plásmidos pRB21 y expresión transitoria de proteínas F

5.1. Mutagénesis de los plásmidos pRB21

Para la mutagénesis de los plásmidos derivados del pRB21 que portaban los genes de las proteínas F quiméricas, y para la mutagénesis de los plásmidos que codifican para los genes de las proteínas F post-fusión del hMPV con mutaciones puntuales, se utilizó el kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific). Los plásmidos pRB21 de partida con los que se generaron y los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis de cada una de las proteínas quiméricas se indican en la Tabla 3. En todos los casos se llevó a cabo una reacción de PCR, siguiendo las indicaciones del fabricante. La mezcla de reacción se preparó con 100 ng del pRB21 usado como molde, 12,5 mM de dNTPs, 10 μ M de los oligonucleótidos y 1 unidad del enzima, en un volumen final de 50 μ l del tampón proporcionado por el fabricante. La mezcla se sometió a los siguientes ciclos de PCR: 1x ciclo de 98°C/2min // 98°C 30seg / 55°C 30 seg / 72°C 4 min (30 ciclos) // 72°C 10 min. El producto de la PCR se digirió con 1 μ l de DpnI, siguiendo las especificaciones del fabricante para eliminar el DNA parental metilado.

Mutante	Esqueleto	Sitio antigénico intercambiado	pRB21 molde	Oligonucleótidos
F-400	Post hRSV F	II	Post hRSV F	P400+ / P400-
F-401			F-400	P401+ / P401-
F-403	Post hRSV F	IV	Post hRSV F	P403+ / P403-
F-404			F-403	P404+ / P404-
F-407	Pre hRSV F	II	Pre hRSV F	P400+ / P400-
F-408			F-407	P401+ / P401-
F-410	Pre hRSV F	IV	Pre hRSV F	P403+ / P403-
F-411			F-410	P404+ / P404-
F-412			F-411	P405+ / P405-
F-414	Post hMPV F _{A1}	II	Post hMPV F _{A1}	P414+ / P414-
F-415			F-414	P415+ / P415-
F-416			F-415	P416+ / P416-
F-417	Post hMPV F _{A1}	IV	Post hMPV F _{A1}	P417+ / P417-

Tabla 3. Mutagénesis de los plásmidos pRB21 para la obtención de proteínas F quiméricas. Se muestra: el nombre de la proteína F quimérica, la proteína de la que se partía para generar esa quimera (esqueleto), el sitio antigénico intercambiado, el pRB21 que se usaba como molde para cada una de ellas y los oligonucleótidos utilizados (ver apartado de mutagénesis en la Tabla 2).

5.2. Transformación de bacterias competentes y selección de bacterias transformadas

Bacterias competentes XL 10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies) se transformaron con los plásmidos pRB21 descritos en el apartado anterior, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las bacterias transformadas se crecieron durante toda la noche a 37°C en placas con medio semisólido Circle-Grow con 100 µg/ml de ampicilina.

Se seleccionaron varias colonias de cada transformación y las bacterias se crecieron en 5 ml de medio líquido LB con 100 µg/ml de ampicilina a 37°C y en agitación durante toda la noche. La extracción del DNA se realizó con el kit QIAprep spin Miniprep (Quiagen), según las instrucciones del fabricante, en el aparato Quiacube (Quiagen). Para comprobar que el plásmido tenía la mutación correcta y que no tenía mutaciones espúreas se secuenció el gen completo de la proteína F en la unidad de Genómica del Centro Nacional de Microbiología, con oligonucleótidos específicos (Tabla 2).

Una vez comprobado que los genes de las proteínas F tenían las mutaciones deseadas se procedió a obtener una mayor cantidad de DNA utilizando el kit NYZMidiprep (NYZtech), siguiendo las especificaciones del fabricante.

5.3. Expresión transitoria en ensayos de infección-transfección con los plásmidos pRB21

Para evaluar la expresión de las proteínas F clonadas en los plásmidos pRB21, se infectaron células CV-1 confluentes crecidas en placas de M6, con un virus vaccinia recombinante que expresa la proteasa furina (moi de 10 pfu/célula), en 1 ml/pocillo de DMEM-0%. Tras una hora de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo y, tras lavar las células con 1 ml/pocillo de DMEM-0%, se les añadió 1 ml por pocillo de DMEM-0%. Mientras tanto se procedió a preparar la mezcla de la transfección. Para ello se preparó, para cada transfección, una mezcla de 100 µl en medio Optimem que contenía 15 µl de Lipofectamina-2000 (Live Technologies) y 5 µg del plásmido pRB21 que codificaba el gen a expresar. Los 100 µl de la mezcla de transfección se añadieron sobre el medio de cultivo de las células CV-1 y se incubó 4-6 h a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se retiró la mezcla de transfección, se lavaron las células con DMEM-0%, se añadió 1ml/pocillo de DMEM-0% y se continuó la incubación durante 24h a 37°C. Pasado ese tiempo se recogieron los sobrenadantes, se clarificaron

mediante minifugación durante 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C y la proteína F se evaluó en un ensayo de ELISA directo (ver apartado 7.1.1 de Material y Métodos). Aquellos plásmidos que tuvieron niveles de expresión aceptables se incorporaron a vaccinias recombinantes para poder expresar dichas proteínas a gran escala y poder purificarlas.

6. Expresión y purificación de proteínas F

Cultivos confluentes de células CV-1 en placas de Petri P150 ($1,3 \times 10^7$ células) se co-infectaron con virus vaccinia que expresa furina (a una moi de 0,025 pfu/célula) y con virus vaccinia que expresan las proteínas F solubles del hMPV o del hRSV, a una multiplicidad de 0,05 puf/célula, en medio DMEM-0%. La infección se dejó progresar 60-72 horas. Transcurrido el tiempo de infección, se recogió el sobrenadante (entre 1 y 2 litros) y se clarificó centrifugándolo en un rotor JA-14 (Beckman) a 10.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Tras la clarificación se añadió un cocktail de inhibidores de proteasas (Protease inhibitor cocktail tablets, complete EDTA-free, Roche) a razón de una pastilla de los inhibidores de proteasas por cada litro de sobrenadante y posteriormente este se concentró con un sistema de flujo tangencial Vivaflow 200 de 50 KDa (Sartorius) hasta un volumen final de 50 ml. Se realizó un cambio de tampón añadiendo 300 ml de 50 mM Na_2PO_4 pH 8,0 y 300 mM NaCl (el medio de cultivo DMEM interfiere con la unión de la cola de histidinas de las proteínas a la columna de Ni^{2+}) y concentrándolo de nuevo hasta un volumen final de 100 ml. Posteriormente se añadió 10 mM Imidazol para que la proteína tuviese el mismo tampón que con el que se equilibra la columna de afinidad por iones (IMAC).

6.1. Cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC)

Para la cromatografía de afinidad por iones metálicos (IMAC) se empleó una resina de agarosa que tenía unida covalentemente Ni^{2+} (His-Select Nickel Affinity Gel, Sigma) empaquetada manualmente en columnas de cromatografía (Kontes® Flex-Column® Chromatography Columns, Kimble Chase). Se empleó un volumen de resina de 5 ml, que es capaz de retener hasta 5 mg de proteína, según las especificaciones del fabricante. Esta columna se lavó con agua y, una vez empaquetada, se equilibró con 20 ml de tampón 50 mM Na_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl y 10 mM Imidazol. La columna se conectó a una bomba peristáltica por donde se pasó el sobrenadante concentrado descrito en el párrafo anterior a un flujo de 0,3 ml/min. Una vez pasada la muestra por la columna, esta se lavó con tampón 50 mM Na_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl y 10 mM Imidazol, hasta obtener valores de $\text{OD}_{280\text{nm}} < 0,05$ en el eluyente. A

continuación se realizó la elución de las proteínas con un tampón 50 mM Na_2PO_4 pH 8,0, 300 mM NaCl y 250 mM Imidazol. Las fracciones eluidas con valores significativos de $\text{OD}_{280\text{nm}}$ se concentraron hasta un volumen de 450 μl utilizando Amicon Ultra -4 centrifugal filters (Milipore, Merck) con un tamaño de poro de 50 kDa.

6.2. Cromatografía de filtración en gel

Para la cromatografía de filtración el gel se empleó una columna Superdex (HiLoad 16/600 Superdex 200pg, GE Healthcare) conectada a un equipo AKTAPrime Plus (GE Healthcare) y equilibrada con tampón 50 mM Na_2PO_4 pH8, 300 mM NaCl. La proteína eluida de la columna de Ni^{2+} y concentrada a 450 μl se minifugó a 14.000 rpm durante 5 min a 4°C y se inyectó en el AKTA. La cromatografía se llevó a cabo a un flujo constante de 0,6 ml/min. Se recogieron fracciones de 1 ml y se fue siguiendo la absorbancia a $\text{OD}_{280\text{nm}}$. Las fracciones correspondientes a un pico homogéneo alrededor del ml 68 (donde eluyen las formas post-fusión de las proteínas F) o del ml 70 (formas pre-fusión de las proteínas) se recogieron y se juntaron. Posteriormente se concentraron con Amicon de 50 KDa hasta concentraciones finales de 0,5-1,5 mg/ml y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7. Técnicas inmunoquímicas

7.1. ELISAs

7.1.1. ELISA directo

A placas de cloruro de polivinilo de 96 pocillos (Cultek) se les añadieron 50-80 ng de antígeno diluido en PBS por pocillo y se incubaron 16 h a 4°C. A continuación los pocillos se saturaron con 150 μl de 1% BSA en PBS (BSA FV, NYZtech) durante una hora. Seguidamente se retiró el bloqueante y se añadieron 50 μl /pocillo de diluciones de los AcMs en 1% BSA en PBS y se continuó la incubación durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se retiró el líquido y las placas se lavaron 5 veces con H_2O . Los complejos inmunes se detectaron añadiendo 50 μl /pocillo de anticuerpo secundario $\alpha\text{-Ig}$ de ratón conjugado con peroxidasa (GE Healthcare) diluido en 1% BSA en PBS, según recomendación del fabricante. Por último, las placas se lavaron de nuevo con agua y se añadieron 50 μl /pocillo de sustrato comercial OPD (Sigma) diluido en tampón 0,1M citrato, 0,2 M fosfato pH 5,5 y H_2O_2 al 0,06%. La reacción colorimétrica se paró añadiendo 50 μl /pocillo de H_2SO_4 3N y se midió la $\text{OD}_{492\text{nm}}$ en un equipo Infinite M200Pro (Tecan).

7.1.2. ELISA de competición

Previamente a los ensayos de ELISA de competición, los AcMs cuya unión se iba a competir, se marcaron con biotina (apartado 4.3 de Materiales y Métodos) y se titularon mediante ELISA directo. Así se determinó la cantidad de AcM capaz de producir una señal significativa pero no saturante en el ELISA (generalmente entre 20-100 ng del AcM marcado). Una vez establecida la cantidad del AcM marcado con biotina, esta se mezcló con cantidades crecientes del AcM competidor no marcado. Las mezclas se añadieron a las placas de cloruro de polivinilo de 96 pocillos, a las que previamente se habían unido 40 ng/pocillo de la proteína F post-fusión del hMPV y que se habían bloqueado con 150 µl/pocillo de 1% BSA en PBS durante una hora. A continuación, las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y el anticuerpo no unido se eliminó por lavados con H₂O. La cantidad de anticuerpo marcado unido al antígeno en cada pocillo se determinó por la adición de estreptavidina-peroxidasa según especificaciones del fabricante y el revelado se realizó mediante sustrato OPD, como se describió en el apartado anterior.

Para cuantificar la competición entre dos AcMs, se obtuvo la EC₅₀ del anticuerpo no marcado con biotina, es decir, la concentración efectiva (expresado en µg/ml) de anticuerpo no marcado que reduce el 50% de la señal del anticuerpo biotinilado. Cuando la señal del anticuerpo marcado disminuyó más de un 75% en presencia del AcM no marcado se consideró que ambos AcMs competían por su unión al antígeno. Cuando la señal disminuyó entre un 50-75% se consideró que los dos AcMs competían parcialmente, y los demás casos se consideró que no competían.

7.1.3. ELISA indirecto (o de captura)

A placas de cloruro de polivinilo de 96 pocillos (Cultek) se les añadió 0,4 µg de los AcMs diluidos en PBS y se incubaron durante 16 horas a 4°C. A continuación los pocillos se saturaron con 150 µl/pocillo de 1% BSA en PBS durante una hora. Posteriormente se retiró el bloqueante y se añadieron 50 µl/pocillo de diluciones seriadas de las proteínas en 1% BSA en PBS continuándose la incubación durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente se retiró el líquido de los pocillos y las placas se lavaron 5 veces con agua. A continuación se añadieron 50 µl/pocillo del anticuerpo secundario α-histidinas (Anti-His; Bio-Rad) (ya que todas las proteínas purificadas tienen el tag de 6-His) marcado con biotina y diluido en 1% BSA en PBS, según especificaciones del fabricante. Tras una hora de incubación se retiró el

anticuerpo secundario, las placas se lavaron 5 veces con H₂O y los complejos inmunes se detectaron por la adición de estreptavidina-peroxidasa (GE Healthcare) y sustrato OPD como se indicó anteriormente.

7.2. Surface plasmon resonance (SPR) (Biacore)

Las constantes de afinidad (K_D) de los fragmentos Fabs unidos a la proteína F se determinaron por “Surface plasmon resonance” (SPR) usando el Biacore X100 (Biacore, Uppsala, Suecia). Para ello, sobre un chip CM5 activado, se unieron covalentemente 10.000 unidades arbitrarias de resonancia (RU) del AcM α -histidinas. Después de eso se unieron a este anticuerpo primario 140 RU de las proteínas a analizar y seguidamente se pasaron los fragmentos Fabs a 8-10 concentraciones distintas (0,5-500 mM) con un flujo de 40 μ l/min. Para la etapa de disociación del Fab se pasó 0,05% Tween20 en PBS al mismo flujo. Por último, para limpiar el “chip” de Fab residual se pasó una solución de 20 mM HCl.

Una vez obtenidos los sensogramas, las constantes de afinidad (K_D) se calcularon utilizando el programa BIAevaluation siguiendo el modelo e Langmuir 1:1 para calcular los parámetros cinéticos. Este programa calcula la constante de afinidad (K_D) dividiendo las pendientes de las curvas de disociación (K_{off}) y de asociación (K_{on}) para cada una de las concentraciones.

8. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas (Western Blot)

Las proteínas (3 μ g) se diluyeron en tampón de muestra (0,08 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS, 10% glicerol, 0,01% de azul de bromofenol) y se separaron electroforéticamente en geles de gradiente continuo de poliacrilamida 4-12% (SDS-PAGE, Bio-Rad), o en geles de poliacrilamida al 10%, en ausencia o presencia de 100 mM de DTT. Las muestras se calentaron 5 min a 100°C antes de cargarlas en el gel. El tampón empleado para la electroforesis fue 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 6,8 y 0,1% SDS. La electroforesis se llevó a cabo a 190 V hasta que el azul de bromofenol, utilizado como colorante del frente, llegó a 0,5 cm del final del gel. El gel se tiñó durante toda la noche con el colorante BlueSafe (NZYtech) y se eliminó el exceso de colorante con agua.

Cuando el gel se utilizó para realizar un Western-blot, la cantidad de proteína que se separó en la electroforesis fue 10 veces menor que para el SDS-PAGE (0,3 µg). Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana Inmobilon-P (Milipore, Merck) en tampón 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 7,5, 0,1% SDS y 20% metanol durante 1,5 h a 250 mA. A continuación se procedió a bloquear las uniones inespecíficas de la membrana con 2% de agente bloqueante (Membrane blocking agente, GE Healthcare) en PBS con 0,01% Tween20. Seguidamente se añadieron los AcM a una concentración de 2 µg/ml diluidos en 5 ml del agente bloqueante y se incubaron una hora con agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación la membrana se lavó 3 veces durante 5 min con 20 ml de 0,01 Tween20 en PBS. Los complejos de antígeno-anticuerpo se detectaron mediante la adición del anticuerpo secundario Ig-mouse conjugado con peroxidasa, diluido 1:5000 en 10 ml del agente de bloqueo incubándose durante una hora con agitación a temperatura ambiente. Tras tres nuevos ciclos de lavado se añadió el sustrato luminiscente ECL (ECL Prime Western Blottin Detection Reagent, GE Healthcare) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las bandas de proteína se visualizaron utilizando el sistema Kodak (Kodak Gel Logic 1500 Imaging System camera) con el software Kodak Imagen Molecular.

9. Microscopia electrónica

Para la visualización de proteínas al microscopio electrónico, sobre una gota (~5 µl) de proteína a ~0.02 mg/ml se depositó una rejilla de cobre recubierta con carbón (CF300-Cu, EMS) que había sido previamente ionizada mediante descarga iónica (Q15OT ES, Quorum). La rejilla fue incubada durante 3-5 minutos con la muestra, lavada 2 veces con buffer 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl y teñida 10 minutos sobre una gota de formiato de uranilo al 1% (p/v). El exceso de líquido se eliminó poniendo la rejilla en contacto con papel de filtro grado 1 (Whatman). Para la visualización de las proteínas se empleó un microscopio electrónico FEI Tecnai 12 (estabilizado a 120 kV) o un microscopio Jeol JEM-1011 (estabilizado a 100 kV) y las imágenes fueron registradas en cámaras CCD Gatan ES1000W Erlangshen o Gatan 1k a unas magnificaciones nominales sobre el detector de 20,400X y 30,000X, respectivamente.

Para análisis mediante microscopía electrónica de inmunocomplejos formados por proteínas F y AcMs o los fragmentos Fabs, se preincubaron 0,1 µg de la proteína F

con 0,1-1 μg de los AcMs o de los Fabs y analizaron como se indica en el párrafo anterior.

Para la obtención de medias bidimensionales de proteína F post-fusión del hMPV se empleó el software Xmipp integrado en la plataforma Scipion. Para los complejos de la proteína F unida a los Fabs MF14, MF16 y MF17 se seleccionaron manualmente 369, 339 y 170 imágenes de complejos, respectivamente, y se obtuvieron medias bidimensionales libres de modelo con la rutina CL2D del paquete Xmipp.

10. Análisis estadístico

Los resultados de los títulos de anticuerpos presentes en los sueros de los ratones realizados en esta se muestran como valores individuales y la media aritmética de cada grupo. Las diferencias estadísticas significativas entre los distintos grupos de sueros se calcularon por análisis de varianza seguidos de un test de Tukey, usando para ello el programa GraphPad Prism 6.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Descripción general de los anticuerpos monoclonales (AcMs) obtenidos en este trabajo

Con el fin de disponer de AcMs específicos de la proteína F del hMPV, de los que se carecía en el laboratorio, se generó un panel de AcMs utilizando las estrategias y metodologías expuestas en el Apartado 4 de Materiales y Métodos. En general, se emplearon distintos inmunógenos mezclados con adyuvante CpG para inducir respuestas de anticuerpos específicos frente a la proteína F en ratones BALB/c. En todos los casos, las inmunizaciones consistieron en dos dosis intramusculares (i.m) de inmunógeno, con un intervalo de cuatro semanas entre cada dosis. Tras las inmunizaciones, los esplenocitos de los ratones se fusionaron con células de mieloma Sp2/0 para generar hibridomas. Los sobrenadantes de los cultivos de hibridomas se ensayaron en ELISA frente a los mismos antígenos con los que se habían inmunizado los ratones, y en algunos casos se evaluó su capacidad de neutralizar la infectividad de los virus NL/1/00 (sublinaje A1) o del virus NL/1/99 (sublinaje B1) del hMPV. Los hibridomas seleccionados se clonaron tres veces por dilución límite y se crecieron para purificar los AcMs y caracterizar en detalle su especificidad.

En la Tabla 4 se muestra un listado de los AcMs agrupados por su competición simultánea para unirse a la proteína F post-fusión del hMPV. También se muestra el isotipo y el sitio antigénico al que se unen los AcMs frente a los que se ha conseguido aislar virus resistentes. Se muestra también su capacidad para neutralizar la infectividad del hMPV (IC_{50}) así como la unión de estos AcMs a las formas post-fusión de la proteína F de los sublinajes A1 (hMPV F_{A1}) y B1 (hMPV F_{B1}) y la forma pre-fusión de hMPV F_{A1}.

Todos los AcMs se unieron de manera parecida a las proteínas F post-fusión de los dos sublinajes estudiados, aunque en general poseen una afinidad ligeramente superior por la proteína post-fusión hMPV F_{B1} que por la post-fusión hMPV F_{A1}. Los AcMs MF1, MF2 y MF3 reconocieron específicamente a la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV y no a la conformación pre-fusión. El resto de los AcMs se unieron de manera similar a las conformaciones pre-fusión y post-fusión de la proteína F del hMPV, a excepción del AcM MF10 que reconoció preferentemente a la conformación pre-fusión de esa proteína.

NOMBRE	INMUNÓGENO	ISOTIPO	SITIO ANTIG	NEUTRALIZACIÓN (IC ₅₀ , µg/ml)		ELISA (EC ₅₀ , µg/ml)		
				hMPV _{A1}	hMPV _{B1}	PRE F _{A1}	POST F _{A1}	POST F _{B1}
MF1	F/Tm ⁻ -Foldon GST-HRA-L-HRB	Ig_G2a_k	6-HB	>30	>30	>0,5	0,41	0,36
MF2	F/Tm ⁻ -Foldon GST-HRA-L-HRB	Ig_G1_k	6-HB	>30	>30	>0,5	0,41	0,37
MF3	F/Tm ⁻ -Foldon GST-HRA-L-HRB	Ig_G2a_k	6-HB	>30	>30	>0,5	0,41	0,37
MF8	F/Tm ⁻ -Foldon	Ig_G2b_k	ND	>30	>30	0,25	0,28	0,25
MF10	Monómero B1	Ig_G1_k	ND	>30	>30	0,43	>0,5	>0,5
MF9	Monómero B1	Ig_G2b_k	II	10,8	0,18	0,22	0,26	0,23
MF12	Monómero B1	Ig_G2a_k	II	1,7	0,6	0,08	0,24	0,21
MF14	Monómero B1	Ig_G1_k	II	0,5	0,2	0,11	0,33	0,30
MF15	Monómero B1	Ig_G2a_k	II	1,45	0,8	0,07	0,21	0,19
MF11	Monómero B1	Ig_G2b_k	IV	>30	>30	0,25	0,04	0,04
MF16	Monómero B1	Ig_G2a_k	IV	1,9	0,34	0,18	0,11	0,10
MF20	Monómero B1	Ig_G1_k	IV	10,6	0,78	0,20	0,12	0,11
MF17	Monómero B1	Ig_G2b_k	ND	>30	0,36	0,34	0,12	0,11
MF18	Monómero B1	Ig_G2b_k	ND	>30	0,61	0,26	0,10	0,09
MF19	Monómero B1	Ig_G2b_k	ND	>30	0,7	0,46	0,10	0,09

Tabla 4. Listado de los AcMs agrupados por su competición simultánea a la proteína post-fusión hMPV F_{A1}. Se indica el nombre de cada AcM, el inmunógeno con el que se inocularon los ratones de los que derivan, el isotipo, el sitio antigénico al que se unen (ver más adelante), el índice de neutralización (IC₅₀) frente a los sublinajes A1 y B1 del hMPV y los valores de unión de estos AcMs (EC₅₀) a las proteínas post-fusión hMPV F_{A1} y hMPV F_{B1} y a la proteína pre-fusión hMPV F_{A1}. El símbolo > hace referencia al límite de detección del ensayo. ND: no determinado.

Respecto a la capacidad para neutralizar la infectividad del hMPV, se observa un amplio rango de valores. Los AcMs MF1, MF2, MF3, MF8 y MF10, no fueron neutralizantes a las concentraciones más altas ensayadas mientras que el resto de los AcMs mostraron valores de IC₅₀ por debajo de 1 µg/ml frente al virus hMPV_{B1}. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la neutralización de la cepa hMPV_{A1}. Así, mientras los AcMs MF12, MF14 y MF15 neutralizaron de forma similar a las dos cepas ensayadas, los anticuerpos MF9, MF16 y MF20 neutralizaron a la cepa hMPV_{B1} 5-10 veces mejor que a la cepa hMPV_{A1}. Un último grupo de AcMs, MF17, MF18 y MF19, sólo neutralizaron a la cepa hMPV_{B1} pese a que se unieron de forma similar a las proteínas de ambos sublinajes en ensayos de ELISA.

2. Ensayos de competición de los AcMs por la unión simultánea a la glicoproteína F del hMPV

Para determinar si los AcMs descritos en la sección anterior reconocen epítomos solapantes en la proteína F del hMPV, se evaluó si estos AcMs competían entre sí para unirse simultáneamente a la proteína post-fusión hMPV F_{A1}. Para ello, los AcMs purificados se marcaron con biotina y su unión al antígeno se compitió con cantidades crecientes de los AcMs no marcados (Figura 12). Se consideró que había competición entre dos AcMs cuando la señal del anticuerpo marcado con biotina se redujo más de un 75%.

AcM	MF1*	MF2*	MF3*	MF8*	MF9*	MF12*	MF14*	MF15*	MF11*	MF16*	MF20*	MF17*	MF18*	MF19*
MF1	0,74	0,8	0,82											
MF2	1,64	1,39	1,47											
MF3	2,8	3,21	2,62											
MF8				2,96										
MF9					0,66	60,68	3,17	1,33						
MF12					0,87	0,9	1,18	3,0						
MF14					0,53	0,53	0,53	0,6		1,26				
MF15					1,32	2,17	0,93	0,78						
MF11									0,72	13,2	6,24			
MF16							1,16	0,98	0,59	0,62	1,69			
MF20							1,8	2,52	9,06	6,52	2,73			
MF17												0,5	0,97	1,3
MF18												1,39	1,35	4,86
MF19												0,74	0,59	0,66
MF10														
Inmuno geno	GST-HRA-L-HRB			F-Tm- Foldon	F-Tm- (Monomero)									

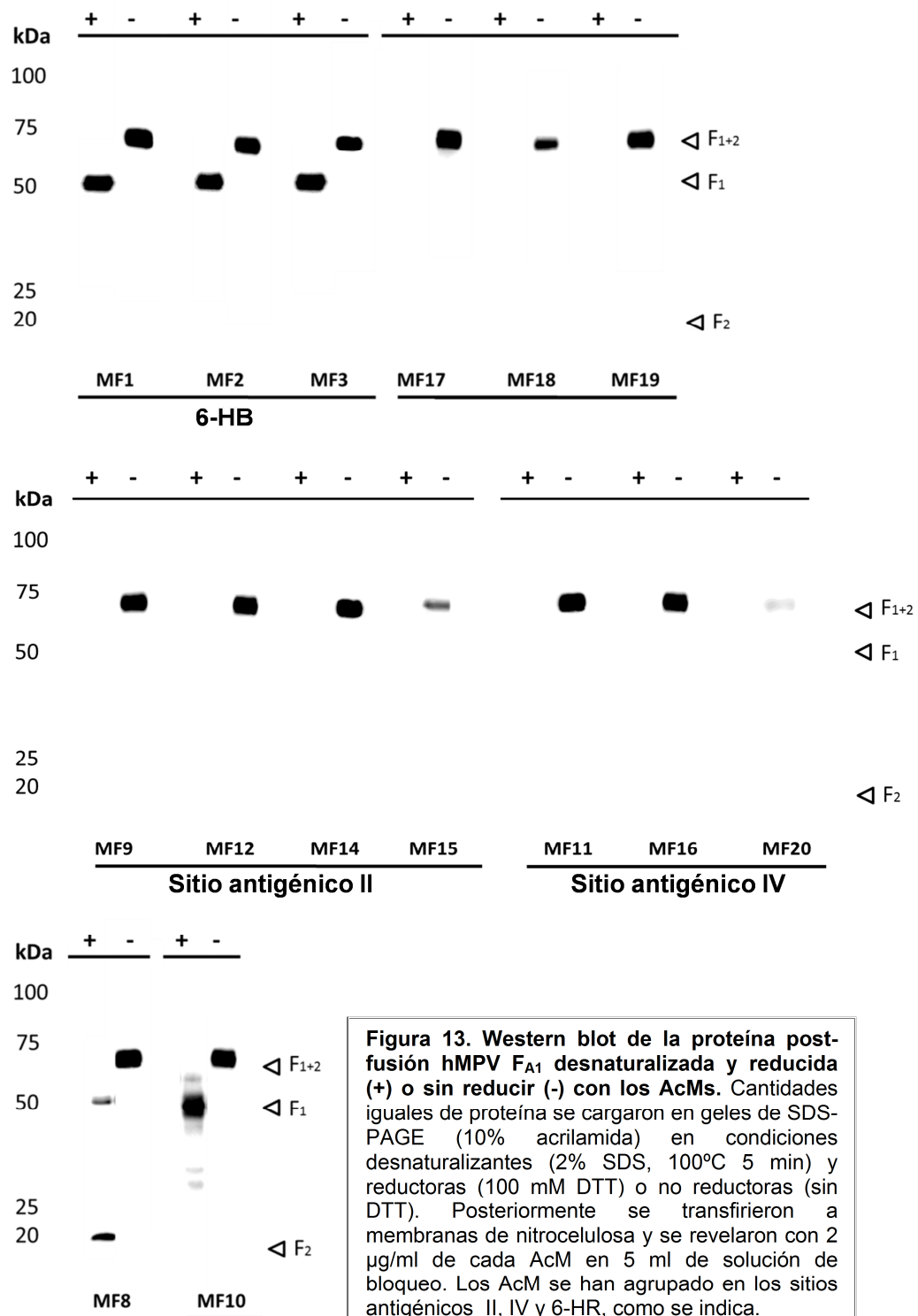
Figura 12. Unión competitiva de los AcMs a la proteína post-fusión hMPV F_{A1}. Los AcMs se marcaron con biotina (indicado con un asterisco) y se ensayaron en ELISA de competición con la proteína post-fusión hMPV F_{A1} frente a los anticuerpos no marcados. Los recuadros en negro indican una reducción superior al 75% de la señal del AcM marcado. Los rayados indican competición parcial (reducción de la señal al 50-75%) y los blancos donde no se observó competición (<50% de reducción de la señal). Los valores de los recuadros corresponden a la EC₅₀ (cantidad, en µg/ml, del AcM no marcado que redujo el 50% de la señal del marcado). El AcM MF10 no se marcó con biotina ya que no se une a la forma post-fusión de la proteína. En la fila inferior de la figura se muestran los inmunógenos empleados para obtener los hibridomas de los que provienen los AcMs.

Se observaron cinco grupos de competición diferenciados. Los AcMs MF1, MF2 y MF3, que se unen al dominio 6-HB de la proteína post-fusión hMPV F_{A1} (ver más adelante) compitieron entre sí pero no compitieron con ningún otro de los AcMs. Otro de los AcMs, MF8, solo compitió consigo mismo por la unión a la proteína. Un

tercer grupo fue el formado por los AcMs MF17, MF18, MF19. Los demás AcMs tenían patrones de competición más complejos. Los AcMs, MF9, MF12, MF14 y MF15 y los AcMs MF11, MF16 y MF20 formaban dos grupos de competición que solapaban parcialmente y en los que se observaban algunas competiciones no recíprocas así como alguna competición parcial.

3. Reactividad de los AcMs en ensayos de “Western blot” con la proteína post-fusión hMPV F_{A1}

Los AcMs de la Tabla 4 se utilizaron en ensayos de Western blot para evaluar su reactividad con la proteína hMPV F_{A1} en condiciones desnaturalizantes y reductoras o no reductoras. Los AcMs dirigidos frente al dominio de 6-HB reconocieron de forma parecida a la subunidad F₁ en condiciones reductoras y a la banda de F₁₊₂ en condiciones no reductoras (donde las subunidades F1 y F2 se mantienen unidas por puentes disulfuro) (Figura 13). La mayoría de los otros anticuerpos reaccionaron, en mayor o menor medida, con la banda F₁₊₂ de la proteína F post-fusión en condiciones no reductoras, pero no reconocieron a las subunidades F₁ o F₂ en condiciones reductoras. Los AcMs MF8 y MF10, para los que no se ha podido determinar un sitio antigénico, reconocieron también a la proteína no reducida; sin embargo, el MF10 reconoció además a la subunidad F₁ reducida y el MF8 reconoció débilmente a las subunidades F₁ y F₂ de la proteína reducida.



4. Caracterización de los anticuerpos monoclonales (AcMs) murinos agrupados por sitio antigénico

En los siguientes apartados se describen las características específicas de los distintos AcMs, agrupados por los patrones de competición mostrados en la Figura 12.

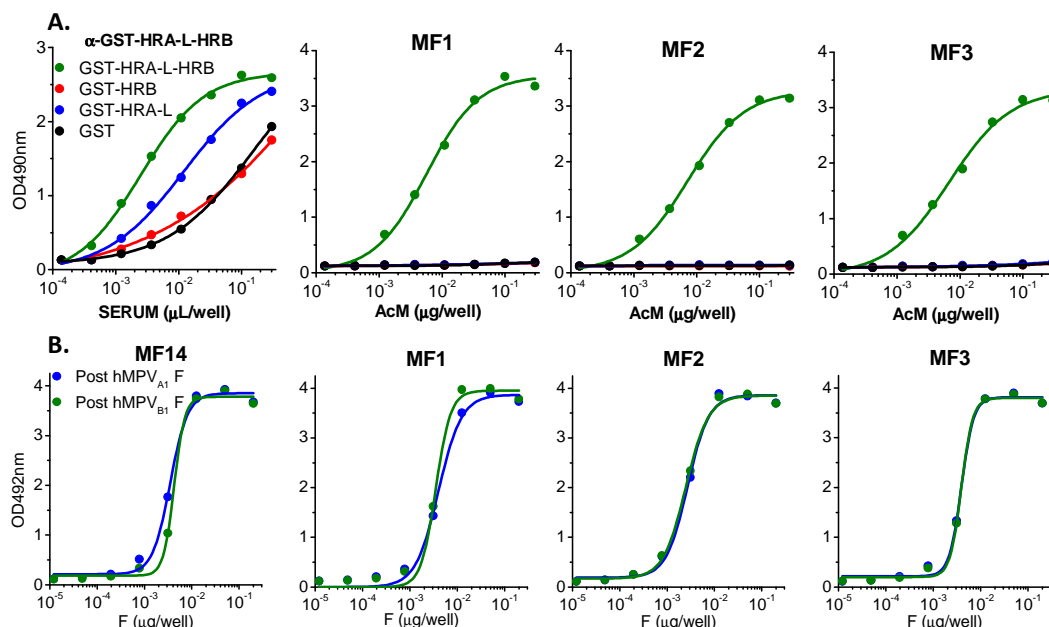
4.1. AcMs específicos del motivo 6-HB de la proteína F post-fusión del hMPV: MF1, MF2 y MF3

Laura Rodríguez había clonado y expresado en nuestro laboratorio las regiones heptádicas HRA y HRB, que forman el motivo de 6-HB de la proteína F del hMPV, fusionadas a la proteína GST (GST-HRA y GST-HRB) (Rodríguez *et al.*, 2015). Además, a la GST-HRA se le había añadido un “linker” (L) (GSSGGV) en su extremo C-terminal (GST-HRA-L) que permitió la construcción de la proteína GST-HRA-L-HRB. Esta última proteína la utilizó para inmunizar conejos New Zealand y así obtuvo anticuerpos policlonales capaces de unirse a la proteína F post-fusión del hMPV.

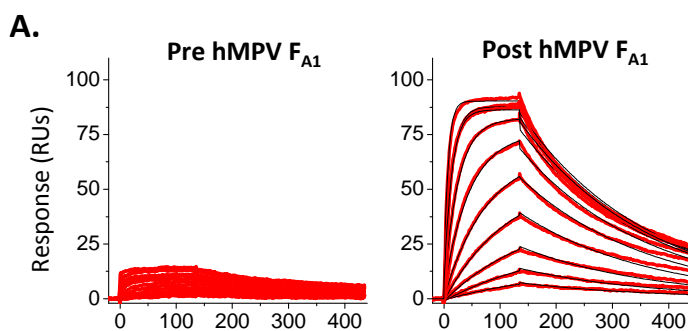
Estos resultados indicaban que se podrían obtener AcMs específicos del motivo 6-HB de la proteína post-fusión hMPV F, inmunizando con el antígeno GST-HRA-L-HRB. Por ello, ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas se inocularon intramuscularmente (i.m.) con 20 µg de proteína post-fusión hMPV F_{A1} purificada, mezclada con adyuvante CpG, y cuatro semanas después se administró un refuerzo de 20 µg de la proteína GST-HRA-L-HRB para potenciar la expansión clonal de aquellos linfocitos que generasen anticuerpos específicos frente al dominio 6-HB. Cuatro días más tarde se sacrificaron los ratones y se aislaron los esplenocitos que se fusionaron con células de mieloma Sp2-0.

Los sobrenadantes de los hibridomas se probaron en ELISA directo frente a la proteína post-fusión hMPV F_{A1} así como frente a la proteína GST-HRA-L-HRB. Se seleccionaron tres hibridomas (MF1, MF2 y MF3), cuyos anticuerpos mostraban una elevada reactividad frente a ambas proteínas y se clonaron tres veces por dilución límite. Estos AcMs se purificaron y su especificidad final se confirmó por ELISA directo como se muestra en la Figura 14. Como controles se emplearon un suero de conejo inmunizado con GST-HRA-L-HRB capaz de reconocer tanto a la proteína completa como a sus componentes por separado (Figura 14.A) y el AcM MF14 (Figura 14.B) que reconoce por igual a las proteínas post-fusión hMPV F_{A1} y hMPV F_{B1} (las características del AcM MF14 se detallarán más adelante). Los AcMs MF1, MF2 y MF3 se unieron eficientemente a la proteína GST-HRA-L-HRB, pero no a

GST ni a GST-HRA-L o GST-HRB (Figura 14.A). Además, en ensayos de ELISA de captura, los tres AcMs unieron eficientemente las proteínas post-fusión hMPV F_{A1} y hMPV F_{B1} (Figura 14.B). Estos resultados indican que los AcMs MF1, MF2 y MF3 se unen al dominio de 6-HB específico de la forma post-fusión de la proteína F del hMPV.



Para estimar la afinidad del AcM MF1 (como ejemplo de los AcMs específicos del dominio de 6-HB) por la proteína F del hMPV, se realizaron ensayos de “surface plasmon resonance” (Biacore) en los que el fragmento Fab del MF1 se unió a las proteínas pre- y post-fusión hMPV F_{A1} inmovilizadas en “chips” de Biacore (Figura 15).



Fab MF1				
Proteína	Rango de concentración	K _p (10 ⁻⁹ M)	K _{on} (1/Ms) x 10 ⁵	K _{off} (1/s) x 10 ⁻⁴
Pre F _{A1}	1-250 nM	-	-	-
Post F _{A1}	7,8-250 nM	7,94	5,51	4,37

Figura 15. Unión del fragmento Fab del AcM MF1 a las proteínas hMPV F_A pre- o post-fusión hMPV F_A, en ensayos de “surface plasmon resonance” (SPR) (Biacore). **A.** Sensogramas de la unión del fragmento Fab del AcM MF1 a las proteínas indicadas en la parte superior de cada panel inmovilizadas en “chips” de Biacore. **B.** Rango de concentraciones del Fab empleado y parámetros calculados de su unión.

Como se observa en la Figura 15, el Fab del AcM MF1 se unió a la proteína post-fusión hMPV F_{A1} con una afinidad de 7,94 nM mientras que no se detectó unión a la forma pre-fusión de esta proteína, confirmando que este tipo de anticuerpos se unen con alta afinidad exclusivamente a la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV.

Por último, la unión de los AcMs α -6HB a la proteína post-fusión hMPV F_{A1} se visualizó mediante microscopía electrónica. La Figura 16 muestra una imagen representativa de la proteína post-fusión hMPV F_{A1} donde se observan moléculas en forma de cono, característica de la forma post-fusión de este tipo de proteínas. Además, se muestran paneles de inmunocomplejos formados por dos moléculas de proteína F unidas en el extremo distal de la cabeza a dos moléculas de cada uno de los AcMs MF1, MF2 y MF3. Estos resultados confirman que esos AcMs reconocen el dominio de 6-HB característico de la forma post-fusión de la proteína F del hMPV.

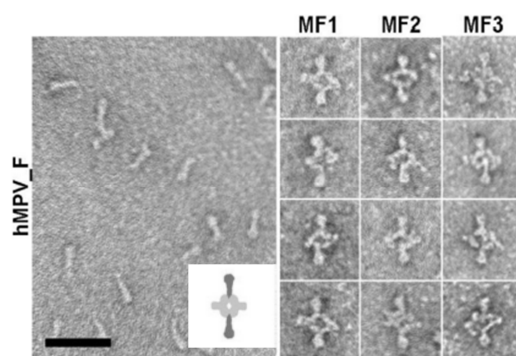


Figura 16. Microscopia electrónica de proteína post-fusión hMPV F_{A1} y de inmunocomplejos con AcMs específicos del dominio de 6-HB. En el panel de la izquierda se muestra una preparación de proteína teñida con formiato de uranilo. A la derecha se muestran imágenes seleccionadas de la proteína F unida a los AcMs indicados, formando inmunocomplejos de dos AcM y dos proteínas. Escala 50 nm. A la izquierda se muestra también insertada una representación esquemática de los inmunocomplejos.

En resumen, los resultados presentados en este apartado confirman que la estrategia de inmunizar con la proteína GST-HRA-L-HRB es una buena opción para la obtención de AcMs que reconocen el motivo estructural de 6-HB, característico de la forma post-fusión de la proteína F del hMPV. Estos AcMs pueden ser de gran utilidad para el estudio de los cambios estructurales que se producen en la glicoproteína F durante el proceso de fusión de membranas.

4.2. AcMs específicos del sitio antigénico II de la proteína F del hMPV: MF9, MF12, MF14 y MF15

Como se muestra en la Figura 12, los AcMs MF9, MF12, MF14 y MF15 compitieron entre sí por la unión simultánea a la proteína post-fusión hMPV F_{A1}. Este grupo de AcMs neutralizantes, así como todos los anticuerpos neutralizantes que se han obtenido durante el desarrollo de esta tesis (que se describirán en apartados posteriores), se obtuvieron a partir de ratones inmunizados con la forma monomérica de la proteína F del hMPV. Se utilizó la forma monomérica de la proteína F porque se ha descrito que, en el caso del hRSV, los AcMs neutralizantes más potentes están dirigidos frente a la forma pre-fusión de la proteína F (Magro *et al.*, 2012; Ngwuta *et al.*, 2015) y que el monómero de la proteína F comparte al menos algunos de esos epítomos. Al no disponer en el momento de la inmunización de la forma pre-fusión de la proteína F del hMPV, los ratones se inmunizaron con el monómero de esta proteína esperando que así se indujeran anticuerpos altamente neutralizantes.

Así, se inmunizaron ratones BALB/c de 6-8 semanas con 20 µg del monómero de la proteína hMPV F_{B1} junto con adyuvante CpG. Cuatro semanas después se administró un refuerzo con 20 µg del monómero sin adyuvante y tres días más tarde se llevó a cabo la fusión de los esplenocitos con células de mieloma Sp2/0. Los sobrenadantes de los hibridomas se probaron en ELISA directo frente al monómero hMPV F_{B1} y en ensayos de microneutralización frente al virus recombinante hMPV_{B1}-GFP. Los hibridomas cuyos sobrenadantes mostraron una capacidad de neutralizar el 90-100% de la infectividad del virus, se clonaron tres veces por dilución límite y se purificaron con proteína A-Sepharosa.

4.2.1. Reactividad de los AcMs con la proteína F del hMPV y capacidad neutralizante

Con los AcMs purificados se evaluó su unión a las proteínas pre- y post-fusión hMPV F_{A1}. Como se muestra en la Figura 17.A, los 4 AcMs se unieron eficientemente a ambas conformaciones de la proteína en ensayos de ELISA. También se evaluó su capacidad para neutralizar la infectividad de los virus hMPV_{A1}-GFP y hMPV_{B1}-GFP. Los AcMs MF12, MF14 y MF15 neutralizaron eficientemente y de forma similar a ambas cepas, con IC₅₀ menores de 2 µg/ml, mientras que el AcM MF9 neutralizó sustancialmente mejor al virus hMPV_{B1}-GFP que al hMPV_{A1}-GFP.

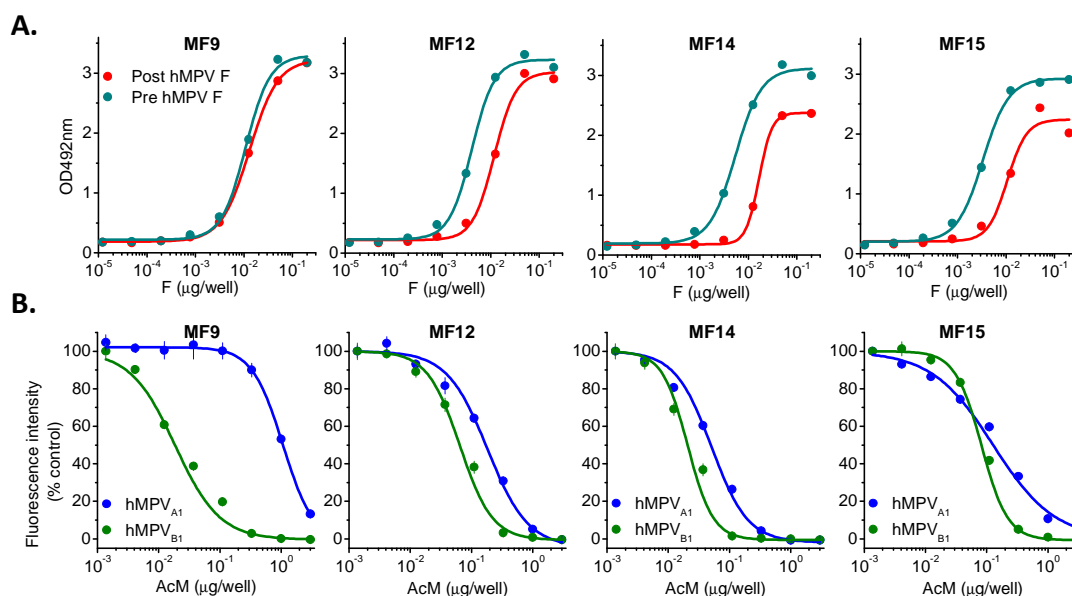


Figura 17. Ensayos de ELISA (A) y microneutralización (B) con los AcM dirigidos frente al sitio II de la proteína F del hMPV. **A.** 0,4 μg de los AcMs MF9, MF12, MF14 y MF15 se ensayaron en ELISA de captura frente a diluciones seriadas de las proteínas pre- y post-fusión hMPV F_{A1} . **B.** La capacidad neutralizante de los AcMs se evaluó en ensayos de microneutralización de los virus hMPV $_{A1}$ -GFP y hMPV $_{B1}$ -GFP, midiendo la reducción de la intensidad de la fluorescencia de células infectadas con virus que expresan GFP, 48 horas después de la infección. Los resultados se presentan como porcentaje del valor de fluorescencia en ausencia del AcM.

Para determinar con mayor precisión la afinidad del AcM MF14 (como representante del sitio antigénico II) por la proteína F del hMPV se evaluó la unión de su fragmento Fab a la proteína hMPV F_{A1} en sus conformaciones pre- y post-fusión en ensayos de “surface plasmon resonance”. Como se observa en la Figura 18, dicho Fab se une a ambas conformaciones de la proteína, pero lo hace 3 veces más rápido a la conformación post-fusión que a la pre-fusión (ver valores de K_{on} en el panel B de la Figura 18), mientras que la cinética de disociación (valores de K_{off}) es igual para ambas conformaciones. Por ello, la afinidad de este Fab por la proteína F post-fusión es tres veces mayor que para la pre-fusión.

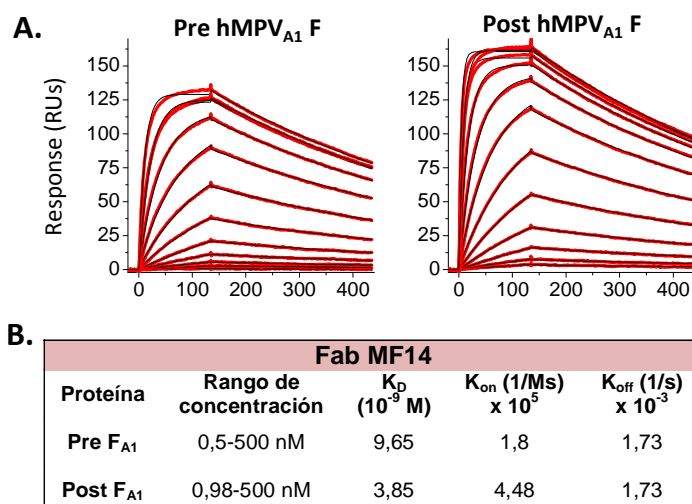


Figura 18. Unión en ensayos de “Surface plasmon resonance” (SPR) (Biacore) del fragmento Fab del AcM MF14 a la proteína hMPV F_{A1} en su forma pre- o post-fusión. **A.** Sensogramas de la unión de los fragmentos Fabs del AcM MF14 a las proteínas indicadas en la parte superior. **B.** Rango de concentraciones del Fab empleado y parámetros calculados de su unión.

4.2.2. Virus resistentes a los AcM neutralizantes dirigidos frente a epítomos del sitio antigénico II del hMPV

Para localizar los epítomos de los AcMs descritos en el apartado anterior en la estructura primaria de la proteína F, se seleccionaron virus mutantes resistentes a la neutralización por los AcMs MF9, MF12, MF14 y MF15. Para ello, el virus hMPV_{A1}-GFP se pasó en presencia de cantidades crecientes de estos AcM. Los virus se consideraron resistentes cuando, en presencia de 200 µg/ml del AcM, el nivel de infección observada en el microscopio de fluorescencia era similar a la de ese mismo pase de virus en ausencia de anticuerpo.

Con cada anticuerpo se aisló un virus resistente que se ensayó para neutralización cruzada con los otros tres AcMs que competían por la unión al antígeno (Figura 12). Los dos virus resistentes seleccionados con los AcM MF9 y MF15 (virus rMF9 y rMF15) fueron resistentes solamente frente a esos dos AcM (Tabla 5), mientras que los AcMs MF12 y MF15 neutralizaron su infectividad con valores de IC₅₀ similares a los obtenidos con el virus “wild-type”. Los virus resistentes a los AcMs MF12 y MF14 (rMF12 y rMF14) fueron resistentes a esos dos AcMs y además al MF9, pero no al AcM MF15.

AcM	hMPV _{A1} -GFP	Virus resistente IC ₅₀ (µg/ml)			
	IC ₅₀ (µg/ml)	rMF9	rMF12	rMF14	rMF15
MF9	7,2	>100	>100	>100	75,3
MF12	1,8	1,9	>100	>100	2
MF14	0,6	0,7	>100	>100	0,8
MF15	1,7	>100	0,5	0,53	>100
Cambio de aa		ND	A238T	A238T	A225V

Tabla 5. Caracterización de virus resistentes seleccionados con los AcMs MF9, MF12, MF14 y MF15. Se muestra la IC₅₀ (en µg/ml) de los AcMs indicados a la izquierda, frente al virus “wild type” hMPV_{A1}-GFP y a los virus resistentes obtenidos (marcados como “r” y el nombre del AcM con el que se seleccionaron). Los valores en negrita indican que los virus fueron resistentes a esos AcMs. En la línea inferior se muestran las mutaciones localizadas en la secuencia de la proteína F de los virus resistentes respecto a la secuencia original del virus hMPV_{A1}-GFP. La proteína F del rMF9 no se consiguió secuenciar. ND, no determinado.

Para localizar las mutaciones en la proteína F de los virus resistentes se extrajo el mRNA de células infectadas con dichos virus y se secuenció el cDNA de la proteína F (ver el apartado 3.3.3 de Materiales y Métodos). En la línea inferior de la Tabla 5 se muestran los cambios de aminoácido en los distintos virus. Los virus rMF12 y rMF14 tenían una transición G/A en el nucleótido 712 que se tradujo en el cambio A238T. El

virus rMF15 tenía la transición C/T en el nucleótido 674 que se tradujo en el cambio A225V. El mRNA de la proteína F del virus rMF9 no se consiguió secuenciar. En la estructura primaria de la proteína F del hMPV, los residuos 225 y 238 están situados en la región equivalente al sitio antigénico II de la proteína F del hRSV (Ulbrandt *et al.*, 2008). En resumen, por la localización de los cambios A225V y A238T, se puede concluir que los AcMs MF9, MF12, MF14 y MF15 se unen a epítomos localizados en el sitio antigénico II de la proteína F del hMPV.

4.2.3. Reactividad de los AcMs con mutantes simples en el sitio antigénico II de la proteína post-fusión hMPV F_{A1}

Para aumentar el espectro de residuos de la proteína F del hMPV implicados en la interacción con los AcMs que se unen al sitio antigénico II y para caracterizar mejor sus epítomos se generaron proteínas post-fusión hMPV_{A1} F con mutaciones puntuales en este sitio antigénico. Ulbrandt y col. (Ulbrandt *et al.*, 2008; Ulbrandt *et al.*, 2006) describieron algunos mutantes del hMPV resistentes a anticuerpos que se unen a epítomos del sitio antigénico II. En la Tabla 6 se muestran las posiciones donde esos autores localizaron las mutaciones en virus resistentes así como las posiciones equivalentes en la proteína F del hRSV y su relevancia para la reactividad con AcMs neutralizantes que se unen al sitio antigénico II de la proteína F del hRSV.

hMPV F	Mutación Puntual	hRSV F	Importancia en hRSV	Ref.
Ala₂₃₈	A238E	Asn ₂₆₈	La mutación N268I en la F del hRSV hace que se pierda por completo la reactividad del AcM 47F	(Arbiza <i>et al.</i> , 1992)
Lys₂₄₂	K242N	Lys ₂₇₂	Las mutaciones K272M y K272Q en hRSV F se han encontrado en virus resistentes al AcM Palivizumab	(Zhao <i>et al.</i> , 2004)

Tabla 6. Residuos del sitio antigénico II incorporados a la proteína F del hMPV. Se muestran los residuos de la proteína F del hMPV donde se localizan los cambios de aminoácido identificados por Ulbrandt y col. en virus resistentes a AcMs que reconocen epítomos del sitio antigénico II. Se indica el residuo equivalente en la proteína F del hRSV y la importancia de dicho residuo en la resistencia a la neutralización por AcMs de hRSV.

Las proteínas solubles post-fusión hMPV F_{A1} con las mutaciones A238E o K242N se produjeron en células CV-1 infectadas con los correspondientes virus vaccinia recombinantes. Transcurridas 48h desde la infección se recogieron los sobrenadantes, se concentraron 20 veces y se ensayaron en ELISA con los AcMs. La Figura 19 muestra los resultados obtenidos. El AcM MF1, que se une al dominio 6-HB y que se utilizó como control, reconoció por igual a la proteína “wild-type” y a las dos

proteínas mutantes. La unión del resto de los AcMs de la Tabla 4, excepto los del sitio antigénico II, tampoco se vio afectada por los cambios de aminoácidos presentes en las dos proteínas mutantes (datos no mostrados).

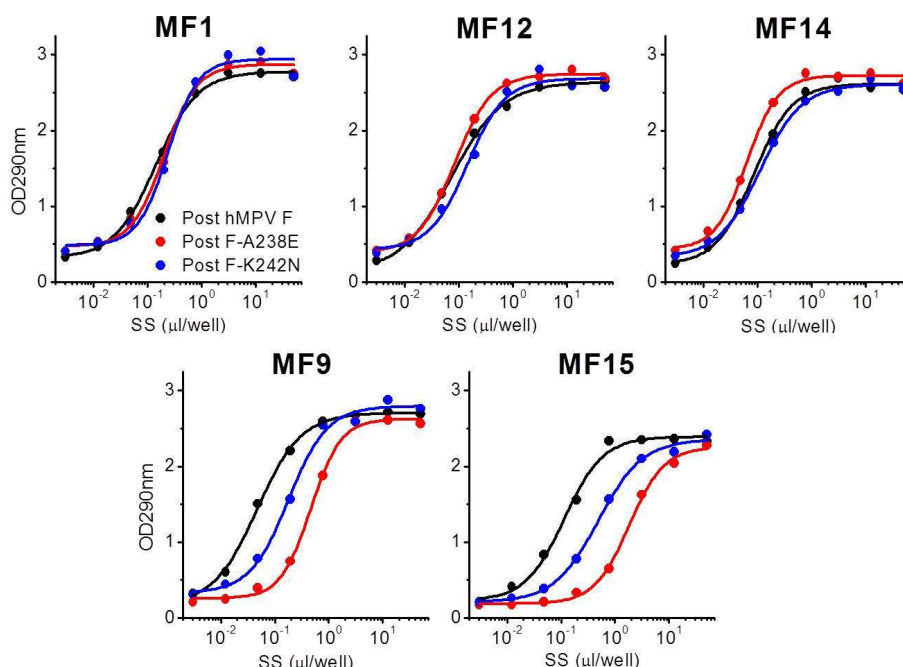


Figura 19. Unión a la proteína post-fusión hMPV F_{A1} y a las proteínas con mutaciones simples A238E y K242N de los AcMs que reconocen epítomos del sitio antigénico II. El AcM MF1 se utilizó como control para normalizar la cantidad de proteína presente en los sobrenadantes. Se utilizaron 0.4 μ g de cada anticuerpo para capturar diluciones seriadas de los sobrenadantes de células infectadas con virus vaccinias recombinantes que expresaban la proteína post-fusión hMPV F_{A1} o dos proteínas F_{A1} con las mutaciones A238E y K242N. La unión de las distintas proteínas se reveló como en el ELISA de captura descrito en el apartado 7.1.3 de Materiales y Métodos.

Las mutaciones A238E y K242N inhibieron parcialmente la unión de los AcMs MF9 y MF15 (Figura 19). Para ambos AcMs el cambio A238E tuvo más efecto inhibitorio que el K242N. La unión de los AcMs MF12 y MF14 a la proteína F no se vio afectada por los cambios de aminoácidos A238E o K242N.

Comparando los resultados de las mutaciones seleccionadas en virus resistentes frente a los AcMs MF12 y MF14 (mutación A238T) (Tabla 6), y la reactividad en ELISA de esos mismos AcMs frente a la proteína post-fusión hMPV F_{A1} con la mutación A238E, se observa que el cambio A238T confiere resistencia a la neutralización por esos AcMs, mientras que el cambio A238E no produce pérdida de reactividad de esos AcMs en ELISA. Aunque se desconocen las causas de esta aparente discrepancia, es de resaltar que las proteínas mutantes se generaron a partir de la forma post-fusión de la proteína y, por tanto, cabe la posibilidad de que la

mutación A238E tenga efectos distintos sobre las conformaciones pre-fusión y post-fusión de la proteína F del hMPV.

En la Figura 20 se muestra la estructura secundaria del sitio antigénico II de la proteína hMPV F_{A1} y las posiciones donde se han localizado mutaciones en los virus resistentes así como los residuos que han producido una pérdida de la unión de los AcMs específicos del sitio II de las proteínas post-fusión hMPV_{A1} F mutantes. En ella, la posición 225 está localizada cerca del extremo N-terminal de la primera α -hélice del sitio antigénico II y los residuos 238 y 242 están situados en posiciones cercanas al loop que conecta las α -hélices N- y C-terminal.

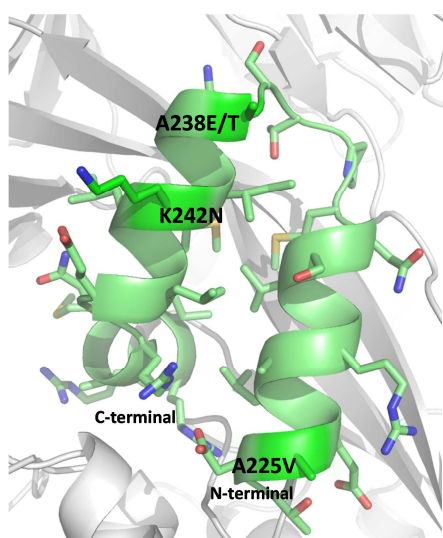


Figura 20. Localización de los residuos implicados en la interacción de los AcMs específicos del sitio antigénico II a la proteína F del hMPV_{A1}. Estructura del sitio antigénico II de la proteína F del hMPV_{A1}. En verde brillante se muestran los residuos implicados en la unión y/o en la resistencia de los virus resistentes a los AcMs específicos del sitio II de la proteína F del hMPV.

Por último, inmunocomplejos del Fab del AcM MF14 unido a la proteína F post-fusión del hMPV se tiñeron con formiato de uranilo y se visualizaron al microscopio electrónico. En la Figura 21 se muestra una media bidimensional de los inmunocomplejos obtenidos. Se observa que la unión de estos Fabs a la proteína se produce en la mitad inferior de la cabeza de la proteína F post-fusión, donde según la estructura determinada para esa proteína se localiza el sitio antigénico II, confirmando así la localización del epítipo del AcM MF14 deducida por otros métodos.

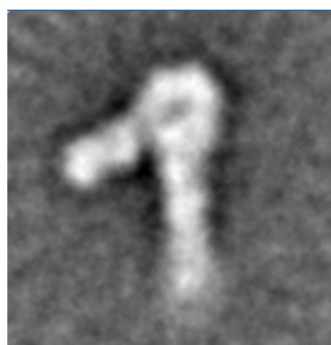


Figura 21. Unión del Fab del AcM MF14 a la proteína F post-fusión del hMPV_{A1}. Media bidimensional obtenida a partir de imágenes de microscopía electrónica del inmunocomplejo formado por el Fab del MF14 y la proteína F post-fusión. La proteína está orientada con el dominio 6-HB hacia abajo.

4.3. AcMs específicos del sitio antigénico IV de la proteína F del hMPV: MF11, MF16 y MF20

El siguiente grupo de AcMs que compitieron por la unión simultánea a la proteína post-fusión hMPV F_{A1} (Figura 12) fue el formado por los AcMs MF11, MF16 y MF20. La inmunización de los ratones y la selección de los hibridomas que producen estos AcMs fue igual que para los AcMs caracterizados en el apartado anterior.

4.3.1. Reactividad de los AcMs con la proteína F del hMPV y capacidad neutralizante

Con los tres AcMs purificados se evaluó su unión a las proteínas pre- y post-fusión hMPV F_{A1} en ensayos de ELISA. El AcM MF11 reconoció algo mejor a la proteína hMPV F_{A1} en su conformación post-fusión que a la forma pre-fusión (Figura 22). Los otros dos AcMs se unieron de manera similar a ambas conformaciones de la proteína. También se evaluó la capacidad de estos AcMs para neutralizar a las cepas hMPV_{A1}-GFP y hMPV_{B1}-GFP. El AcM MF11 no neutralizó la infectividad del hMPV_{A1}-GFP y lo hizo muy débilmente al hMPV_{B1}-GFP. El AcM MF20 neutralizó algo mejor a hMPV_{B1}-GFP que a hMPV_{A1}-GFP. El AcM MF16 fué el único capaz de neutralizar de manera similar a las dos cepas de sublinajes distintos del hMPV ensayadas, con valores de IC₅₀ menores de 2 µg/ml.

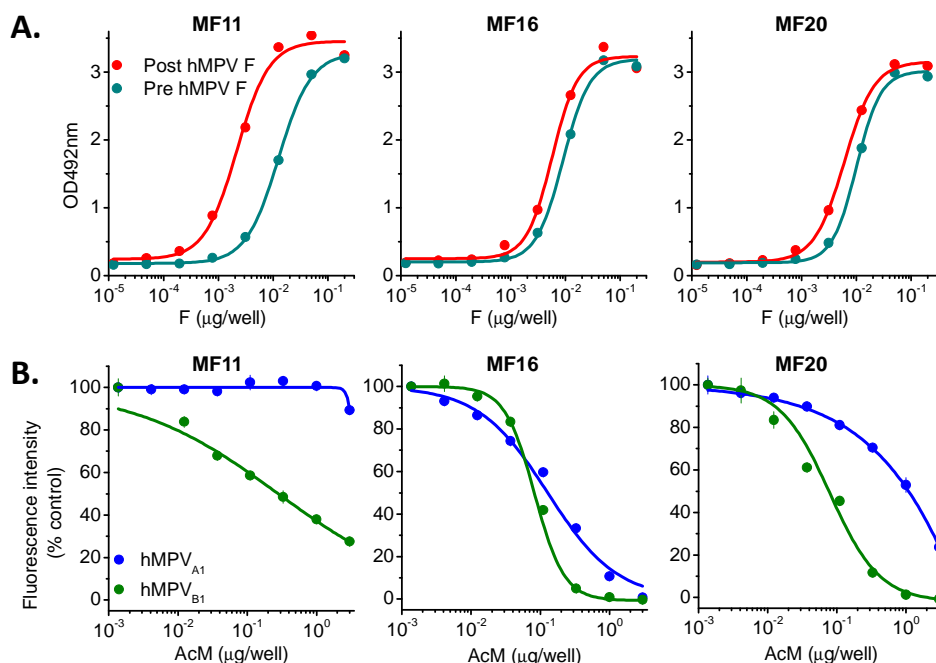


Figura 22. Análisis mediante ELISA (A) y microneutralización (B) de los AcM dirigidos frente al sitio antigénico IV de la proteína F del hMPV. A. 0,4µg de los AcMs MF11, MF16, MF20 se ensayaron en ELISA de captura frente a diluciones seriadas de las proteínas pre- y post-fusión hMPV F_{A1}. **B.** La capacidad neutralizante de los AcMs se evaluó en ensayos de microneutralización con los virus hMPV_{A1}-GFP y hMPV_{B1}-GFP.

También se determinó la afinidad del AcM MF16 (como representante del sitio antigénico IV) por la proteína F del hMPV. Para ello se evaluó la unión de su fragmento Fab a las conformaciones pre- y post-fusión hMPV F_{A1} en ensayos de SPR. Los resultados se muestran en la Figura 23. Como ya ocurrió para el Fab del AcM 14 (Figura 18), el Fab del MF16 también se une a las dos conformaciones de la proteína F del hMPV, pero es tres veces más afín por la conformación post-fusión que por la pre-fusión (ver valores de K_D). Este Fab (a diferencia del Fab del AcM MF14) se unió prácticamente igual a ambas conformaciones (valores de K_{on}), pero la disociación del Fab con la proteína pre-fusión hMPV F_{A1} es más rápida (valores de K_{off}), de ahí que la afinidad sea mayor por la conformación post-fusión que por la pre-fusión.

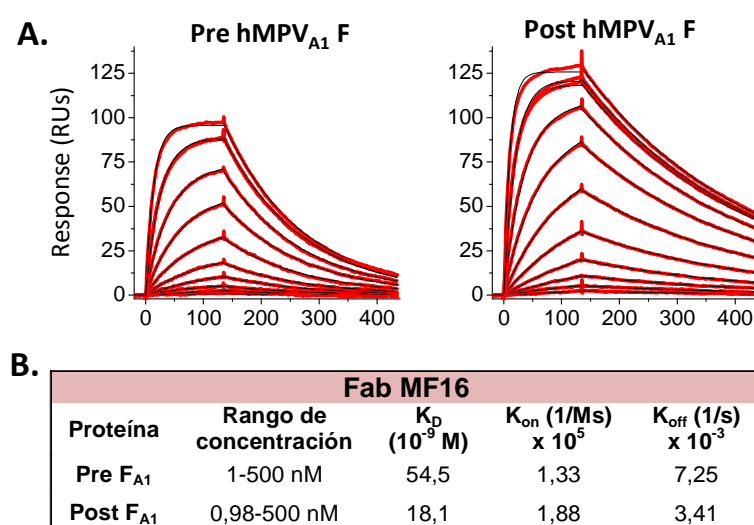


Figura 23. Unión en ensayos de “surface plasmon resonance” (SPR) (Biacore) del fragmento Fab del AcM MF16 a la proteína hMPV F_{A1} en su forma pre- o post-fusión. A. Sensorgramas de la unión de los fragmentos Fabs del AcM MF16 a las proteínas indicadas en la parte superior. B. Rango de concentraciones del Fab empleado y parámetros de unión calculados.

4.3.2. Virus resistentes a los AcM neutralizantes dirigidos frente a epítopos del sitio antigénico IV del hMPV

Se seleccionaron virus resistentes a los AcMs MF16 y MF20. Se descartó la posibilidad de aislar virus resistentes al AcM MF11 debido a su escasa capacidad neutralizante. De nuevo, se realizaron pases sucesivos del virus hMPV_{A1}-GFP en presencia de cantidades crecientes de los AcMs MF16 o MF20 y los virus se consideraron resistentes cuando, en presencia de 200 μ g/ml del AcM, la infección con el virus resistente fue similar a la de ese mismo pase de virus pero sin anticuerpo.

Con los virus resistentes se llevaron a cabo neutralizaciones cruzadas con los dos AcMs neutralizantes que competían entre sí por su unión al antígeno (Tabla 7). Mientras que el virus resistente seleccionado con el AcM MF16 (rMF16) fue resistente tanto frente al AcM MF16 como al MF20; el virus seleccionado con el AcM MF20 solo fue resistente frente al AcM con el que se seleccionó y no frente a MF16, que fue

capaz de neutralizarlo con valores de IC_{50} similares a los obtenidos con el virus hMPV_{A1}-GFP “wild-type.

AcM	hMPV _{A1} -GFP IC_{50} (μg/ml)	Virus resistente IC_{50} (μg/ml)	
		rMF16	rMF20
MF16	2,1	>100	3,7
MF20	11,3	>100	>100
Cambio de aa		V397A	K401E

Tabla 7. Caracterización de virus resistentes seleccionados con los AcMs MF16 y MF20. Se muestra la IC_{50} (en μg/ml) de los AcMs indicados a la izquierda, frente al virus original hMPV_{A1}-GFP y a los virus resistentes obtenidos. Los valores en negrita indican que los virus fueron resistentes a esos AcMs. En la línea inferior se muestran las mutaciones localizadas en la proteína F de los virus resistentes respecto a la secuencia original del virus hMPV_{A1}-GFP.

De nuevo se identificaron mediante secuenciación las mutaciones en la proteína F del hMPV_{A1}-GFP que conferían resistencia a la neutralización por esos AcMs. En la línea inferior de la Tabla 7 se muestran los cambios de aminoácidos encontrados. El virus rMF16 tuvo una transversión T/A en el nucleótido 1190, que se tradujo en un cambio V397A. Por su parte, el virus rMF20 mostró una transversión en el nucleótido 1202 (A/T), que se tradujo en el cambio K401T. La localización de los cambios V397A y K401E en la estructura primaria de la proteína F indica que los AcMs MF16 y MF20 se unen al sitio antigénico IV de la proteína (Ulbrandt *et al.*, 2008).

4.3.3. Reactividad de los AcMs con mutantes simples del sitio antigénico IV de la proteína post-fusión hMPV F_{A1}

La Tabla 8 muestra las tres mutaciones descritas por Ulbrandt y col. en virus resistentes a AcMs dirigidos frente al sitio antigénico IV de la proteína F del hMPV (Ulbrandt *et al.*, 2008). También se muestran las posiciones equivalentes en la proteína F del hRSV así como la relevancia de esas posiciones para la unión de AcMs específicos del sitio IV de la proteína F del hRSV.

hMPV F	Mutación puntual	hRSV F	Importancia en hRSV	Ref.
Lys ₃₈₆	K386E	Val ₄₁₈	No se han aislado virus resistentes con mutaciones en este residuo	
Val ₃₉₇	V397F	Arg ₄₂₉	Péptido con la mutación R429S pierde parcialmente la reactividad con el AcM 101F	(Wu <i>et al.</i> , 2007b)
Lys ₄₀₁	K401T	Lys ₄₃₃	La mutación K433T se encontró en virus resistentes al AcM 101F	(Wu <i>et al.</i> , 2007b)

Tabla 8. Residuos del sitio antigénico IV de la proteína F del hMPV identificados en mutantes de escape descritos anteriormente. Se muestra el aminoácido y la mutación descrita por Ulbrandt y col. (2008) en virus resistentes a AcMs del sitio antigénico IV, así como el residuo homólogo en la proteína F del hRSV y la importancia de dicha posición en la evasión de la neutralización por AcMs de hRSV

Para caracterizar mejor los epítomos con los que interaccionan los AcMs MF11, MF16 y MF20, se generaron plásmidos que codificaban las proteínas post-fusión hMPV F_{A1} hMPV con las mutaciones simples descritas en la Tabla 8. Los plásmidos se incorporaron a virus vaccinias recombinantes con los que se infectaron células CV-1. Las proteínas se purificaron a partir de células infectadas por cromatografía de afinidad por iones de Ni²⁺ y cromatografía de filtración en gel como se explica en el apartado 6 de Materiales y Métodos. La unión de los AcMs MF11, MF16 y MF20 a las distintas proteínas se evaluó por ELISA, y sus resultados se muestran en la Figura 24. El AcM MF1 (que se une al motivo 6-HB de las proteínas post-fusión) utilizado como control se unió de forma similar a todas las proteínas ensayadas. La mutación K386E afectó parcialmente a la unión del AcM MF11. La mutación V397F produjo la pérdida de unión del AcM MF20 a la proteína. Por último, la mutación K401T redujo parcialmente la unión del AcM MF16 y eliminó la reactividad con el AcM MF20.

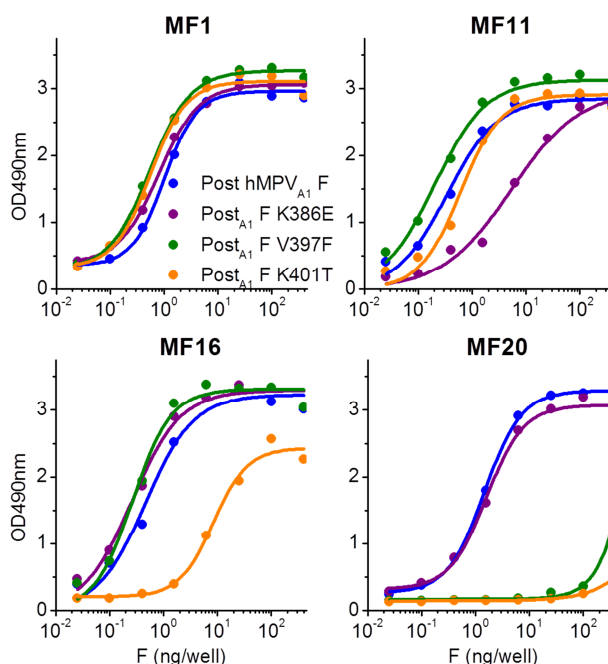


Figura 24. Reactividad de los AcMs dirigidos frente al sitio antigénico IV con las proteínas F mutantes K386E, V397F y K401T. El AcM MF1 se utilizó como control para la normalización de la cantidad de cada proteína. 0,4µg de cada anticuerpo se utilizó en ELISA de captura frente a diluciones seriadas de la proteína F post-fusión del hMPV y de las proteínas mutantes indicadas.

Las mutaciones V397A y K401E, que se seleccionaron en los virus resistentes a los AcMs MF16 y MF20, se localizan en las mismas posiciones que las introducidas en las proteínas post-fusión hMPV_{A1} F, aunque el cambio de aminoácido es distinto. Estos resultados confirman la relevancia de los residuos 397 y 401 para la integridad de los epítomos reconocidos por los AcMs MF16 y MF20. En la Figura 25 se muestra la localización de los residuos implicados en la unión de los AcMs específicos del sitio

antigénico IV a la proteína F del hMPV_{A1} F. Los tres residuos cambiados en mutantes de escape y en proteínas mutantes se encuentran en zonas muy expuestas de la superficie del sitio antigénico IV de la proteína.

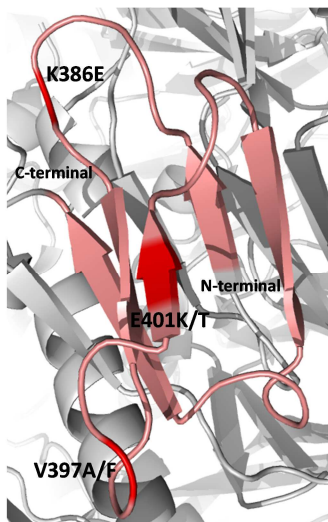


Figura 25. Localización de los residuos implicados en la interacción de los AcMs específicos del sitio antigénico IV a la proteína F del hMPV_{A1}. Estructura del sitio antigénico IV de la proteína F del hMPV_{A1} (resaltado en rojo pálido). En rojo intenso se muestran los residuos implicados en la unión y/o en la resistencia de los virus resistentes a los AcMs específicos del sitio IV de la proteína F del hMPV.

Por último se formaron inmunocomplejos de los Fab de estos AcMs unidos a la proteína F post-fusión del hMPV que se tiñeron con formiato de uranilo y se visualizaron al microscopio electrónico. En la Figura 26 se muestra una reconstrucción bidimensional de los inmunocomplejos entre el Fab del AcM MF16 a y la proteína post-fusion hMPV_{A1} F, donde se observa que el Fab se une hacia la mitad de la cabeza de la proteína, en concordancia con la localización del sitio antigénico IV en esa conformación de la proteína F del hMPV (Mas *et al.*, 2016).

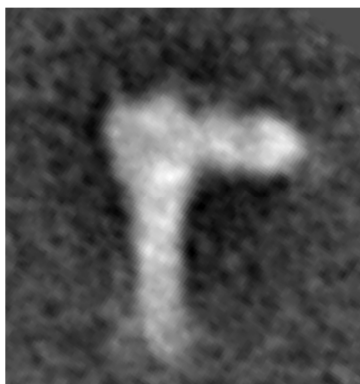


Figura 26. Unión del Fab del AcM MF16 a la proteína F post-fusión del hMPV_{A1}. Media bidimensional obtenida a partir de imágenes de microscopía electrónica del inmunocomplejo formado por el Fab del MF16 y la proteína F post-fusión. La proteína está orientada con el dominio 6-HB hacia abajo.

4.4. AcMs dirigidos frente a un sitio antigénico todavía no localizado en la proteína F del hMPV: MF17, MF18 y MF19

Como se muestra en la Figura 12, los anticuerpos monoclonales MF17, MF18 y MF19 compitieron entre sí por la unión simultánea a un sitio antigénico de la proteína post-fusión hMPV F_{A1}. Los tres AcMs reconocieron de manera similar a las proteínas F post-fusión de los sublinajes A1 y B1 (Tabla 4). Igualmente, estos tres AcMs se unieron a las conformaciones pre- y post-fusión hMPV F_{A1} (Figura 27). Sin embargo, estos AcMs no fueron capaces de neutralizar (o neutralizaron muy débilmente) la infectividad del hMPV_{A1}-GFP mientras que neutralizaron eficientemente al hMPV_{B1}-GFP. Actualmente no hay una explicación para la aparente disparidad entre el reconocimiento de las proteínas pre- y post-fusión hMPV F_{A1} en ELISA por los anticuerpos MF17, MF18 y MF19 y su incapacidad de neutralizar la infectividad del virus hMPV_{A1}-GFP.

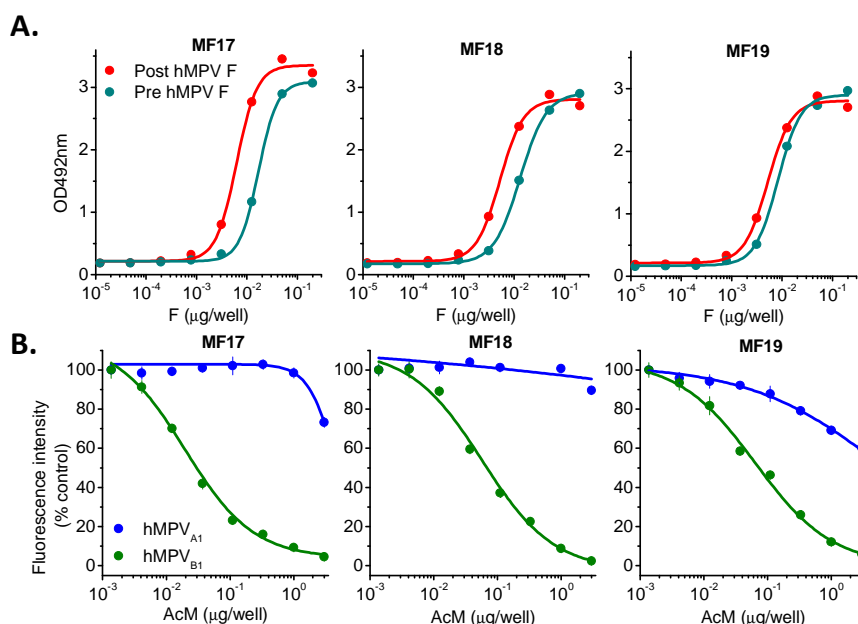


Figura 27. Análisis mediante ELISA (A) y microneutralización (B) de los AcM MF17, MF18, MF19. A. 0,4µg de los AcMs se ensayaron en ELISA de captura frente a diluciones seriadas de las proteínas pre- y post-fusión hMPV F_{A1}. B. Ensayo de neutralización de los virus hMPV_{A1}-GFP y hMPV_{B1}-GFP por los AcMs indicados.

De la misma manera que se ha descrito anteriormente para otros AcMs, se generaron virus hMPV_{B1}-GFP resistentes a los tres AcMs, MF17, MF18 y MF19 y se llevaron a cabo neutralizaciones cruzadas entre los virus resistentes y los distintos AcMs. Ninguno de los tres AcMs fue capaz de neutralizar la infectividad de los virus resistentes obtenidos con cualquiera de los AcMs (datos no mostrados). Es decir, había una total cross-resistencia que probablemente se deba a que los epítopos que

reconocen estos tres AcMs sean similares. Pero no se ha conseguido secuenciar todavía sus proteínas F, por lo que no se han podido localizar en la estructura primaria de la proteína F los cambios de aminoácidos que confieren resistencia a esos AcMs.

Por último se formaron inmunocomplejos entre el Fab del AcM MF17 y la proteína F post-fusión del hMPV, que se tiñeron con formiato de uranilo y se visualizaron al microscopio electrónico. En la Figura 28 se muestra una reconstrucción bidimensional de los inmunocomplejos resultantes. El Fab de este AcM se une hacia la parte inferior de la cabeza de la proteína F post-fusión. Hasta momento son se han descrito anticuerpos que se unan a esa región de la proteína F, tanto del hRSV (*Calder et al.*, 2000) como del hMPV (esta Tesis) indicando que probablemente el AcM MF17 reconoce un epítipo de un sitio antigénico no descrito hasta ahora.



Figura 28. Unión del Fab del AcM MF17 a la proteína F post-fusión del hMPV_{A1}. Media bidimensional obtenida a partir de imágenes de microscopía electrónica del inmunocomplejo formado por el Fab del MF17 y la proteína F post-fusión. La proteína está orientada con el dominio 6-HB hacia abajo.

5. Expresión y caracterización de proteínas F quiméricas

Como se ha mencionado anteriormente las proteínas F del hMPV y del hRSV son muy similares en su estructura (Battles *et al.*, 2017; Mas *et al.*, 2016). Por ello, postulamos que se podrían intercambiar ciertos residuos entre las dos proteínas sin que eso afectase sensiblemente al plegamiento local de la proteína F quimérica resultante.

Así, a partir de plásmidos (derivados del pRB21) que codificaban para las proteínas F pre- y post-fusión del hRSV, y para la proteína F post-fusión del hMPV_{A1}, se diseñaron plásmidos que codificaban proteínas F quiméricas, en los que se intercambiaron residuos de los sitios antigénicos II y IV de un virus por los homólogos del otro virus, como se muestra en la Figura 29.

La expresión transitoria de esas proteínas F se evaluó infectando células CV-1 con un virus vaccinia recombinante que expresa furina y transfectando a continuación dichas células con los plásmidos pRB21 que llevaban insertos las proteínas F quiméricas. Los sobrenadantes se probaron en ELISA para determinar el nivel de expresión de las quimeras, en comparación con la proteína “wild-type” de la que procedían, cuyo valor se tomó como 100%.

Algunas de las proteínas quiméricas, como las proteínas F post-fusión del hRSV con los sitios antigénicos II (F-400 y F-401) y IV (F-403 y F-404) del hMPV, se expresaron a niveles indetectables. Otras, como las generadas a partir de la proteína F pre-fusión del hRSV con el sitio antigénico II del hMPV (F-407 y F-408) o la quimera F post-fusión del hMPV con el sitio IV de hRSV (F-417), tuvieron un rendimiento muy bajo y se decidió no continuar con su análisis.

Figura 29. Listado de las proteínas “wild-type” y de las quimeras, codificadas en plásmidos pRB21. El código de cada proteína F quimérica se indica en la parte izquierda de la figura, distribuidas en grupos. En la línea superior de cada grupo se muestra la proteína “wild-type” de la que parte ese grupo de quimeras. En la línea inferior se indica la proteína cuyo sitio antigénico se ha intercambiado en las quimeras. La primera parte del nombre de las quimeras corresponde a la proteína de partida y la segunda parte al sitio antigénico que se ha intercambiado. En las secuencias, los números situados arriba y abajo corresponden a la posición de los residuos de cada proteína F indicada. Las secuencias del hRSV y del hMPV están representadas en rojo y azul respectivamente. Los residuos compartidos entre ambas proteínas están coloreados en magenta en las proteínas quiméricas. Los niveles de expresión transitoria se estimaron por ELISA a partir de sobrenadantes de células infectadas y transfectadas, como se indica en Materiales y Métodos, utilizando como anticuerpo de captura un AcM α -Foldon (común para todas las proteínas). Los niveles de expresión transitoria se normalizaron tomando los niveles de la proteína “wild-type” de la que parten como 100%. Los números indicados en negrita corresponden a las quimeras que se incorporaron a virus vaccinia recombinantes. * muestra una quimera no incluida en vaccinia por motivos explicados en el texto.

CÓDIGO	MUTANTE	SECUENCIA	EXPRESIÓN TRANSITORIA
		260 270 280	
		
	POST hRSV F	ELL ^{SL} LINDMPITNDQKKLMSNNVQI	100
F-400	Post hRSV F / Sitio II hMPV F	ELL ^{SL} LINDMPITAGQIKLML ^{ENV} QI	< 1
F-401	Post hRSV / Sitio II hMPV F	ELL ^{SL} LINDMPITSAGQIKLML ^{ENV} QI	< 1
	POST hMPV F	ELARAVSNMPTSAGQIKLML ^{EN} RAM	
		
		230 240 250	
		420 430 440 450	
		
	POST hRSV F	VSCYGKTKCTASNKNRGI ^{IK} TFSNGCDYVSNKGVD ^T	100
F-403	Post hRSV F / Sitio IV hMPV F	VSCYGKTKCTASNKNVGI ^{IK} QLNKGCDYVSNKGVD ^T	< 1
F-404	Post hRSV F / Sitio IV hMPV F	VSCYGKTKCSIGSNRVGI ^{IK} QLNKGCDYVSNKGVD ^T	< 1
	POST hMPV F	VACYKGVSCSIGSNRVGI ^{IK} QLNKGCSYITNQDAD ^T	
		
		380 390 400 410	
		260 270 280	
		
	PRE hRSV F	SELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIV ^R	100
F-407	Pre hRSV F / Sitio II hMPV F	SELLSLINDMPITAGQIKLML ^{ENV} QIV ^R	4
F-408	Pre hRSV F / Sitio II hMPV F	SELLSLINDMPITSAGQIKLML ^{ENV} QIV ^R	2
	POST hMPV F	AELARAVSNMPTSAGQIKLML ^{EN} RAMV ^R	
		
		230 240 250	
		420 430 440 450	
		
	PRE hRSV F	VSCYGKTKCTASNKNRGI ^{IK} TFSNGCDYVSNKGVD ^T	100
F-410	Pre RSV F / Sitio IV hMPV F	VSCYGKTKCTASNKNVGI ^{IK} QLNKGCDYVSNKGVD ^T	68
F-411	Pre RSV F / Sitio IV hMPV F	VSCYGKTKCSIGSNRVGI ^{IK} QLNKGCDYVSNKGVD ^T	45
F-412	Pre hRSV F / Sitio IV hMPV F	VSCYKGVSCSIGSNRVGI ^{IK} QLNKGCDYVSNKGVD ^T	23*
	POST hMPV F	VACYKGVSCSIGSNRVGI ^{IK} QLNKGCSYITNQDAD ^T	
		
		380 390 400 410 420	
		220 230 240 250	
		
	POST hMPV F	TDAELARAVSNMPTSAGQIKLML ^{EN} RAMV ^{RR}	100
F-414	Post hMPV F / Sitio II hRSV F	TDAELARAVSNMPTSNDQKKLMSNNRAMV ^{RR}	97
F-415	Post hMPV F / Sitio II hRSV F	TDAELARAVSNMPITNDQKKLMSNNRAMV ^{RR}	96
F-416	Post hMPV F / Sitio II hRSV F	TDAELL ^{SL} LINDMPITNDQKKLMSNNRAMV ^{RR}	10
	POST hRSV F	TNSELLSLINDMPITNDQKKLMSNNVQIV ^{RQ}	
		
		250 260 270 280	
		380 390 400 410 420	
		
	POST hMPV F	LVACYKGVSCSIGSNRVGI ^{IK} QLNKGCSYITNQDAD ^T VTI	100
F-417	Post hMPV F / Sitio IV hRSV F	LVACYKGVSCSIGSNRGI ^{IK} TFSNGCSYITNQDAD ^T VTI	8
	POST hRSV F	IVSCYGKTKCTASNKNRGI ^{IK} TFSNGCDYVSNKGVD ^T VS ^V	
		
		410 420 430 440 450	

Las quimeras que tuvieron un nivel de expresión superior al 10% respecto a la proteína “wild-type” de la que partían, se incorporaron a virus vaccinia recombinantes para su expresión y posterior caracterización antigénica e inmunogénica. Las proteínas F quiméricas que se describen en este apartado de la tesis son las que están basadas en la proteína F post-fusión del hMPV e incorporan un número creciente de residuos del sitio antigénico II de la proteína F del hRSV (quimeras F-415 y F-416) y las que están basadas en la F pre-fusión del hRSV con cambios de aminoácidos correspondientes al sitio antigénico IV del hMPV (quimeras F-410 y F-411).

5.1. Proteínas quiméricas F post-fusión del hMPV con el sitio antigénico II del hRSV

5.1.1. Expresión y caracterización de proteínas quiméricas F post-fusión del hMPV con el sitio antigénico II del hRSV

El sitio antigénico II de la proteína F del hRSV (aminoácidos 254 a 277) y de la proteína F del hMPV (residuos 224 a 247) tienen una estructura secundaria formada por dos α -hélices unidas por un “loop”. Los sitios antigénicos II están expuestos en la superficie de dichas proteínas tanto en su conformación pre-fusión como post-fusión. De los 24 aminoácidos que componen ese sitio antigénico, 9 residuos son idénticos entre las proteínas del hRSV y del hMPV, lo que representa ~38% de identidad de secuencia. Por su similitud estructural y de secuencia (Mas *et al.*, 2016) postulamos que se podrían intercambiar ciertos residuos entre las dos proteínas sin que ello afectase al plegamiento local de la proteína F quimérica resultante.

Se generaron tres proteínas F quimeras, F-414, F-415 y F-416, donde se reemplazaron un número creciente de residuos del sitio antigénico II del hMPV por sus equivalentes del sitio antigénico II del hRSV. Como los niveles de expresión de la proteína F-414 eran muy similares a los de la F-415 se decidió no continuar con la quimera F-414.

En la quimera F-415 se intercambiaron 7 residuos de la α -hélice C-terminal y el “loop” del sitio antigénico II de la proteína F post-fusión del hMPV por los equivalentes del hRSV (Figura 30). La quimera F-416 incorporó 6 cambios de

aminoácidos adicionales localizados en la α -hélice N-terminal para así reproducir casi completamente la secuencia del sitio antigénico II de la proteína F del hRSV.

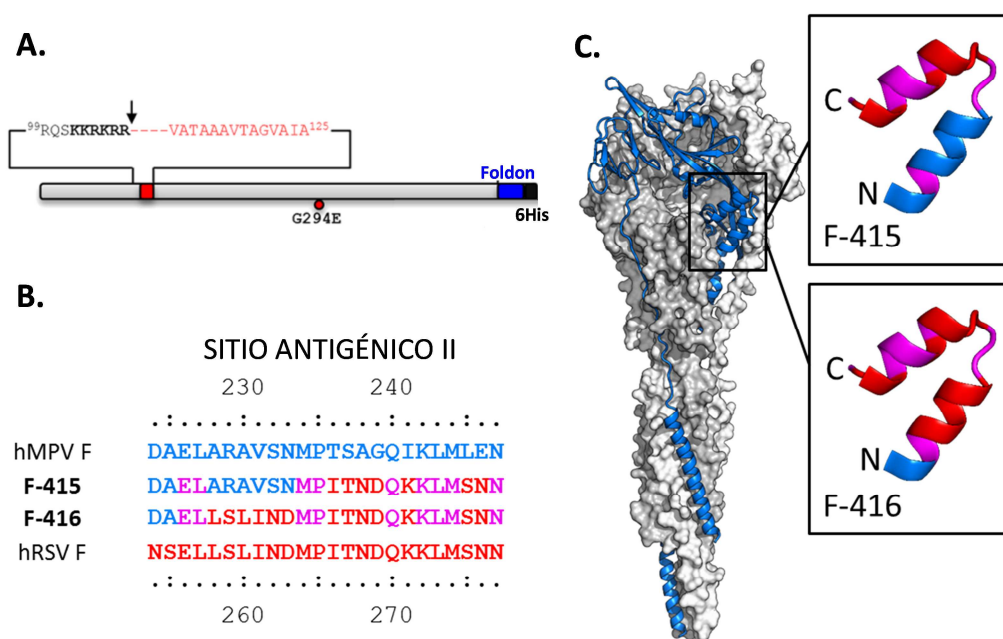


Figura 30. Diseño de las proteínas quiméricas F post-fusión de hMPV con cambios de aminoácidos del sitio antigénico II del hRSV. **A.** Esquema del ectodominio de la proteína post-fusión hMPV_{A1} F (Mas *et al.*, 2016). El sitio de corte del hMPV está cambiado por el sitio de corte II de la proteína F del hRSV (residuos en negrita). Los residuos 103-111 (en rojo) del péptido de fusión están deletados para evitar que las proteínas se agreguen. En azul se muestra el dominio de oligomerización "Foldon" y en negro la cola de histidinas para su purificación. **B.** Secuencia aminoacídica parcial del hMPV (azul) y del hRSV (rojo) correspondiente al sitio antigénico II. Las secuencias parciales de las quimeras F-415 y F-416 están en el color correspondiente a la secuencia de la que proceden (azul o rojo) o en rosa para las posiciones compartidas entre ambas proteínas F del hRSV y del hMPV. **C.** Representación de la estructura de la proteína F post-fusión del hMPV. En gris dos protómeros en representación de superficie, en azul un protómero representado en estructura secundaria. El sitio antigénico II está ampliado y coloreado como en el panel B para las quimeras F-415 y F-416.

Ambas quimeras F-415 y F-416 se purificaron por cromatografía de afinidad a iones de Ni^{2+} y seguidamente por cromatografía de filtración en gel. La Figura 31.A muestra que ambas proteínas eluían como un pico homogéneo de la columna de filtración en gel, aproximadamente en la misma posición que las proteínas F post-fusión del hRSV y del hMPV. Todas esas proteínas mostraron un grado de pureza superior al 95% en SDS-PAGE y estaban totalmente procesadas en las cadenas F₁ y F₂. Cuando se examinaron al microscopio electrónico (Figura 31.C y D), se observó que las proteínas F-415 y F-416 tenían la forma cónica característica de la proteína F post-fusión del hMPV.

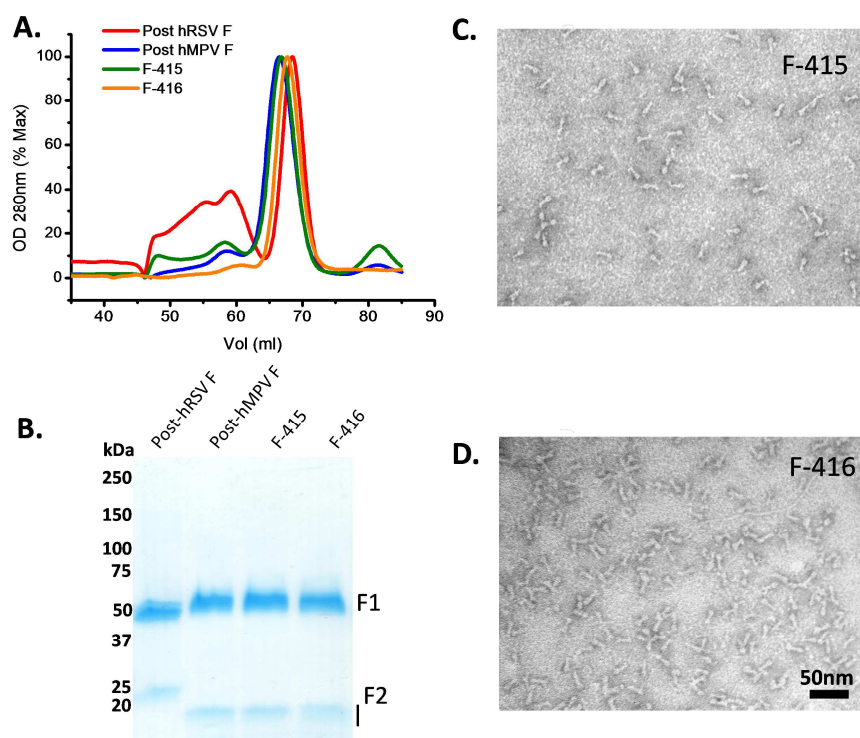


Figura 31. Purificación del ectodominio de las proteínas F quiméricas F-415 y F-416 solubles. **A.** Cromatograma de la filtración en gel. Los perfiles de cada una de las proteínas están normalizados respecto del 100% de la OD₂₈₀ máxima. **B.** SDS-PAGE (gradiente continuo de 4-12% de acrilamida) en condiciones desnaturalizantes y reductoras, teñido con BlueSave. Los números de la izquierda corresponden a la masa molecular (kDa, kilodalton). Las posiciones de las subunidades F1 y F2 se indican a la derecha. **C.** Imágenes de ME obtenidas por tinción negativa de la quimera F-415. **D.** Imágenes de ME obtenidas por tinción negativa de la quimera F-416.

Estas proteínas F quiméricas se probaron en ELISA con AcMs específicos de los sitios antígenicos II del hRSV y del hMPV (Figura 32). La proteína F-415 perdió su reactividad con los AcM dirigidos frente al sitio antígeno II del hMPV (MF9, MF12, MF14 y MF15), pero mantuvo la reactividad con el AcM MF16, que se une al sitio antígeno IV de la F proteína del hMPV. Además, la proteína F-415 ganó reactividad con AcMs específicos del sitio antígeno II de la proteína F del hRSV. Así adquirió una reactividad total con el AcM Motavizumab (Mz) y una reactividad parcial con el AcM 47F. La quimera F-416 también perdió la reactividad con los AcMs específicos del sitio antígeno II del hMPV, pero además ganó una reactividad total no solo con el AcM Mz sino también con el 47F.

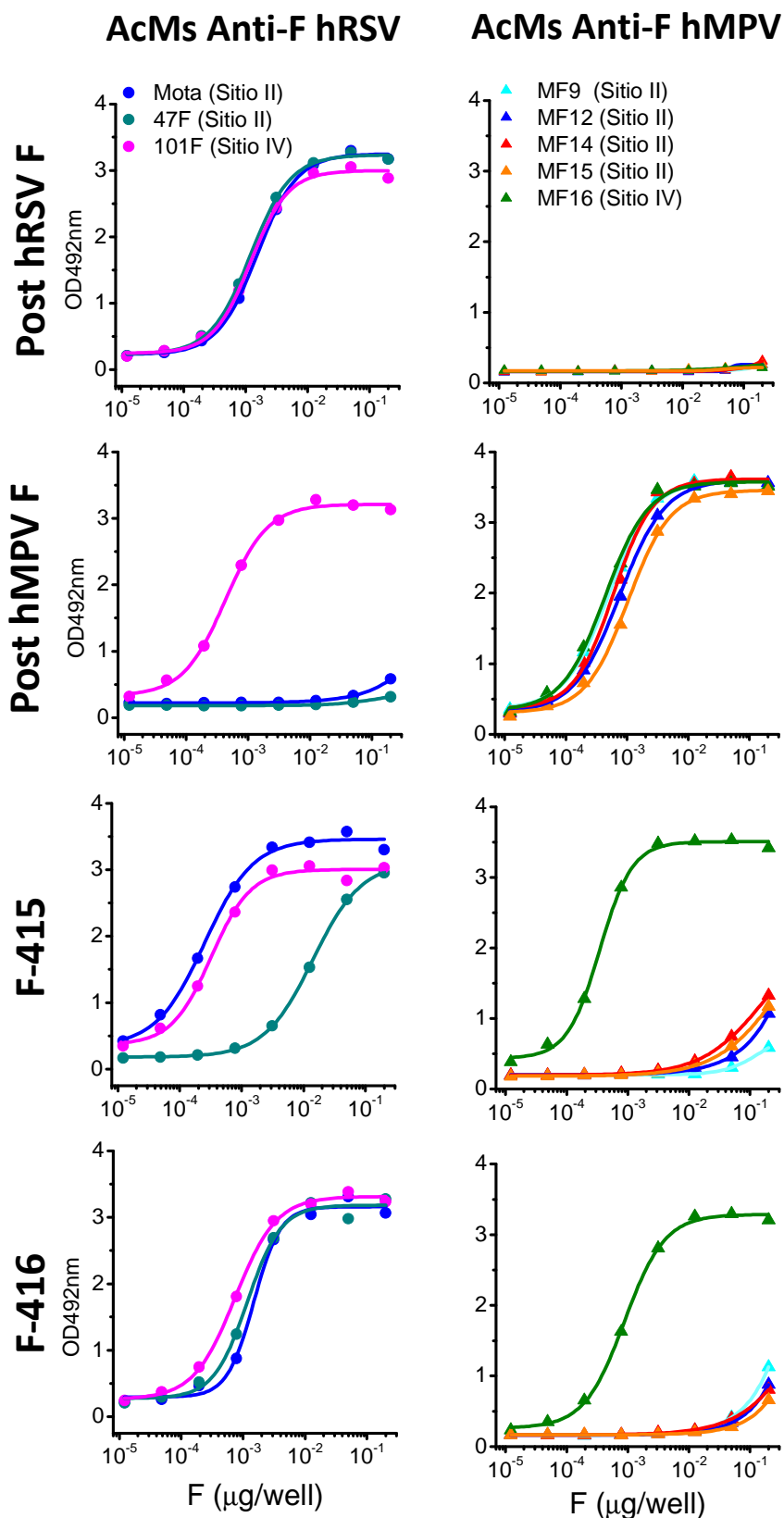
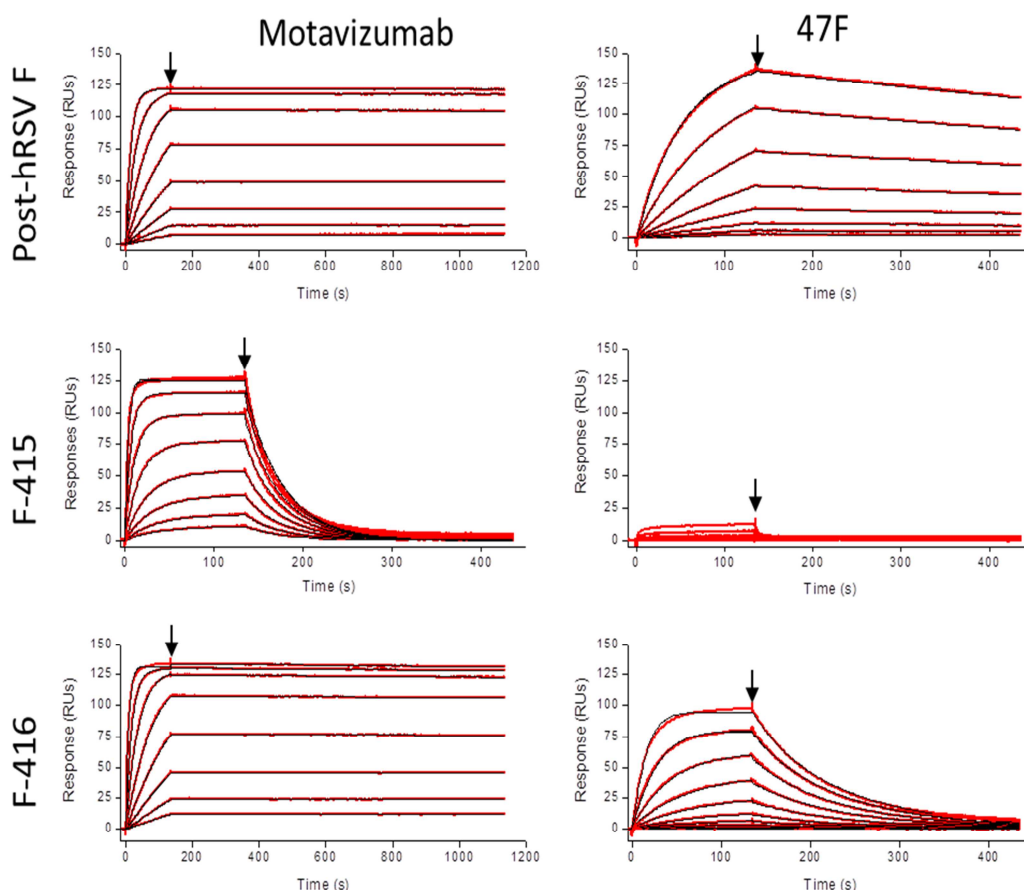


Figura 32. Caracterización antigénica de las proteínas F post-fusión “wild-type” y de las quimeras con AcMs específicos del hRSV y del hMPV. Reactividad en ELISA de captura de los AcMs específicos de hRSV (izquierda) y hMPV (derecha) con las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. La localización de los sitios antigénicos a los que se une cada uno de los AcMs se encuentra entre paréntesis en las dos gráficas superiores.

Para determinar las afinidades de los AcMs Mz y 47F por las proteínas F quiméricas se llevaron a cabo ensayos de “surface plasmon resonance” (SPR, Biacore) con sus respectivos Fabs y con la proteína F post-fusión del hRSV como control (Figura 33).



Fab	Proteína	KD	Kon ($M^{-1} s^{-1}$)	Koff (s^{-1})
Motavizumab	Post-hRSV F	< 9.17 pM	1.09×10^6	$< 1 \times 10^{-5}$
	F-415	24.44 nM	1.00×10^6	2.44×10^{-2}
	F-416	7.82 pM	1.89×10^6	1.48×10^{-5}
47F	Post-hRSV F	7.69 nM	7.75×10^4	5.96×10^{-4}
	F-415	Sin unión		
	F-416	88.15 nM	1.68×10^5	1.48×10^{-2}

Figura 33. Afinidad de los fragmentos Fabs de los AcMs Mz y 47F por la proteína F post-fusión del hRSV y las dos quimeras indicadas, medida por “surface plasmon resonance” (SPR) (Biacore). En la parte superior se muestran las cinéticas de unión y disociación de las proteínas inmovilizadas a los Fab. La flecha señala el principio de la etapa de disociación. RUs, unidades de resonancia. La parte inferior muestra una tabla con los parámetros de unión. K_D , constante de disociación (afinidad), K_{on} , cinética de unión y K_{off} , cinética de disociación.

El Fab del Mz mostró una cinética de unión (ver valores de K_{on}) a la proteína F post-fusión del hRSV similar a la de las dos quimeras, pero la cinética de disociación (K_{off}) fue mucho más rápida para la F-415 que para la proteína F post-fusión del hRSV y la F-416. La afinidad del Fab del Mz por la quimera F-416 es pues similar a la de la proteína F post-fusión del hRSV, pero es menor que para la F-415.

Respecto al Fab del AcM 47F, no se detectó unión a la proteína F-415. La unión del Fab del 47F a la quimera F-416 fue ligeramente más rápida que a la proteína F post-fusión del hRSV, pero su disociación de la quimera fue mucho más rápida, y dio como resultado una afinidad 10 veces menor por la F-416 que por la F post-fusión del hRSV (ver valores de K_D).

Si se comparan los resultados de unión en ELISA de los AcMs Mz y 47F con las dos proteínas quiméricas (Figura 32), y los resultados de unión de sus respectivos Fabs en ensayos de “surface plasmon resonance” (SPR) (Biacore) a dichas proteínas (Figura 33), se observan diferencias significativas entre ambos ensayos. Así, mientras que la unión del Fab del 47F a la quimera F-415 en SPR es prácticamente nula, la unión de esta proteína al AcM 47F en ELISA fue significativa. Igualmente, mientras que la reactividad del AcM Mz con la quimera F-415 es comparable a la de la proteína F post-fusión del hRSV en ELISA, la afinidad de esta quimera por el Fab del Mz está marcadamente disminuida en SPR. Esas diferencias entre ambos ensayos son probablemente debidas a que por un lado la densidad de las proteínas unidas a las placas de ELISA es mucho mayor que la utilizada en los chips de SPR y por otro a la naturaleza bivalente de los AcMs utilizados en ELISA comparada con el carácter monovalente de los Fabs utilizados en el ensayo de SPR.

En resumen, aunque el sitio antigénico II de las proteínas F quiméricas F-415, y sobre todo F-416, tienen propiedades antigénicas semejantes al sitio antigénico II de la proteína F post-fusión del hRSV, aún se observan pequeñas diferencias apreciables con el sitio antigénico II de la proteína F post-fusión del hRSV.

5.1.2. Inmunogenicidad de las proteínas F quiméricas F-415 y F-416

Para determinar la inmunogenicidad de las proteínas F quiméricas F-415 y F-416, grupos de ratones BALB/c se inocularon intramuscularmente (i.m.) con dos dosis de 10 µg de cada una de las quimeras, con un intervalo de 4 semanas entre cada inoculación y mezcladas con CpG como adyuvante. De igual manera se procedió con dos grupos control de ratones, que se inocularon con las proteínas F post-fusión “wild-type” del hRSV y del hMPV. Dos semanas después de la última dosis, se sangraron los ratones y los sueros se utilizaron en ELISA directo para evaluar su capacidad de unión a las proteínas F post-fusión “wild-type” tanto del hRSV como del hMPV (Figura 34).

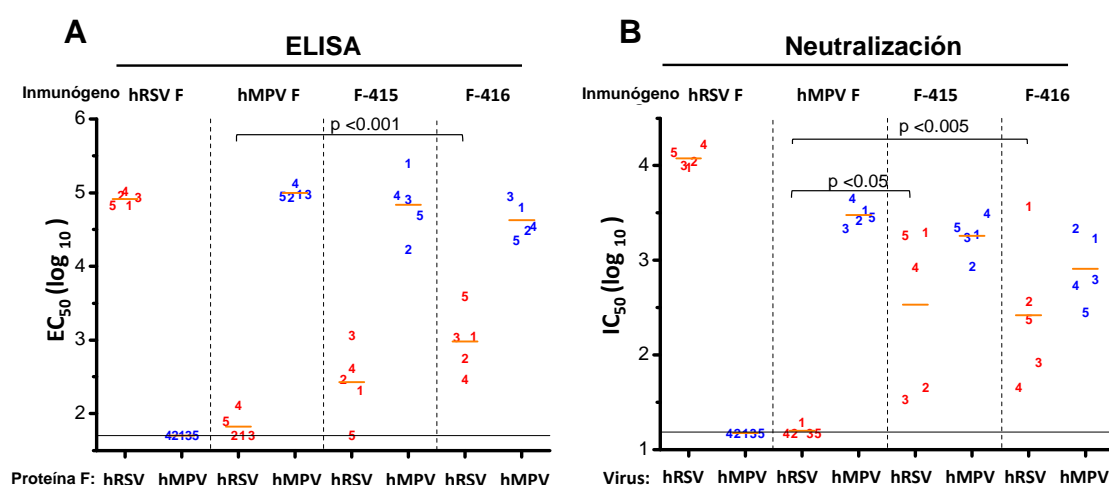


Figura 34. Títulos de ELISA y neutralización de los sueros de ratones inmunizados con las proteínas F post-fusión “wild-type” y quimeras F-415 y F-416. Ratones hembras BALB/c se inmunizaron intramuscularmente (i.m.) con dos dosis del inmunógeno indicado en la parte superior de cada panel. Dos semanas después de la segunda dosis los animales fueron sacrificados y se recogió su sangre. **A.** Cada suero de ratón, identificado con un número, fue probado en ELISA directo frente a las proteínas F post-fusión “wild-type” (antígeno) indicado en la parte inferior de cada panel. Los resultados representados en el eje Y para cada suero representa el logaritmo de la dilución que alcanzó el 50% de unión máxima, expresado en unidades logarítmicas en base 10. ($EC_{50}(\log_{10})$, EC, “effective concentration”). **B.** Los sueros de los ratones también se probaron en microneutralización con los virus hRSV y hMPV_{A1} que se indican en la parte inferior. Los resultados representados en el eje Y para cada suero representa el logaritmo de la dilución que inhibió el 50% de la infectividad viral. ($IC_{50}(\log_{10})$, IC, “inhibitory concentration”).

De acuerdo con resultados anteriores (Mas *et al.*, 2016), las proteínas F post-fusión “wild type” indujeron elevados títulos de Acs que reaccionaban con la proteína homóloga, pero no con la proteína heteróloga (o lo hacían muy débilmente en el caso de los ratones inmunizados con la F post-fusión del hMPV y ensayados frente a la F post-fusión del hRSV). En cambio, los anticuerpos murinos inducidos por la quimera F-415 mostraron una unión considerable no solo a la proteína F

post-fusión del hMPV sino también a la del hRSV (Figura 34.A). Los títulos de Acs con capacidad de unión a la F post-fusión del hRSV en ratones inoculados con la quimera F-416 fueron incluso superiores a los obtenidos con la F-415.

Para determinar si la presencia de Acs capaces de unirse a la proteína F post-fusión del hRSV en sueros de ratones inmunizados con las quimeras F-415 y F-416 se correspondía con una capacidad de neutralizar la infectividad del hRSV, los sueros se evaluaron en ensayos de neutralización *in vitro* (Figura 34.B). De nuevo, los sueros de los ratones inmunizados con las proteínas F post-fusión “wild-type” del hRSV y del hMPV tuvieron unos títulos neutralizantes (IC_{50}) muy elevados exclusivamente frente al virus homólogo. En cambio, los sueros de los ratones inmunizados con las quimeras F-415, y sobre todo con la F-416, mostraron títulos significativos de neutralización frente al hRSV, además de frente al hMPV.

En resumen, las características antigénicas de las proteínas F quiméricas F-415 y F-416, evidenciada por su reactividad frente a AcMs específicos del sitio antigénico II del hRSV (Figura 32), se correlacionó con su capacidad de inducir anticuerpos murinos con capacidad de unirse a la proteína F post-fusión del hRSV así como de neutralizar la infectividad del hRSV, de forma particularmente significativa en el caso de la quimera F-416. Se puede observar, no obstante, que en algunos sueros no parece haber una correlación directa entre los títulos obtenidos en ensayos de unión y en ensayos de neutralización; por ejemplo, el suero del ratón #5 inoculado con F-415 tuvo bajos niveles de unión a la proteína F post-fusión del hRSV en ELISA y sin embargo fue uno de los que neutralizaron más eficientemente al hRSV.

Para evaluar si la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a hRSV por las proteínas quiméricas podía correlacionarse con protección frente a una infección por este virus se llevó a cabo un segundo experimento de inmunización. Grupos de ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas se inocularon con tres dosis de 20 μ g/dosis de las proteínas quiméricas o de las proteínas control, mezcladas con CpG. Una semana después de la última dosis, los ratones se infectaron intranasalmente con hRSV (cepa A2) purificado. Cinco días después de la infección se tituló por plaqueo el virus presente en los pulmones.

Los resultados mostraron nuevamente un incremento significativo en los niveles de anticuerpos neutralizantes frente a ambos virus en los sueros de los

ratones inmunizados con las quimeras F-415 y, sobre todo con la F-416 (extraídos justo antes del desafío), comparados con los sueros de los ratones de los tres grupos control (ratones inoculados solo con CpG o con las F post-fusión del hRSV o del hMPV) (Figura 35). A pesar de que hubo una considerable dispersión en los valores de los títulos de neutralización (IC_{50}) entre los ratones de cada uno de los grupos inmunizados con F-415 y F-416, los títulos de los sueros de ratones inmunizados con la quimera F-416 fueron, de media, más altos que los obtenidos en ratones inoculados con F-415. Cabe resaltar que, en ambos grupos, alguno de los ratones (ratón #7 inoculado con F-415 y ratones #3 y #7 inoculados con F-416) tuvieron títulos de Acs neutralizantes semejantes a los obtenidos con los sueros de los ratones inmunizados con la proteína F post-fusión de hRSV.

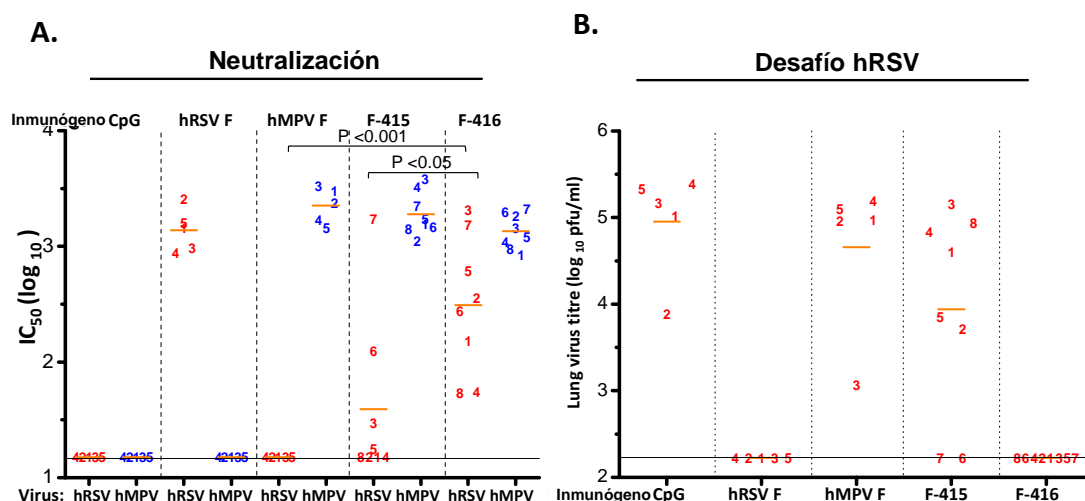


Figura 35. Protección frente a un desafío con hRSV de ratones inmunizados con proteínas F quimeras generadas a partir de la F post-fusión de hMPV. Ratones BALB/c se inocularon tres veces (con un intervalo de cuatro semanas) con 20 μ g de las proteínas F post-fusión indicadas como inmunógeno en la parte superior de cada panel. Otro grupo fue inoculado solo con adyuvante CpG. Tres semanas después de la última inoculación se extrajo sangre del seno supramandibular y una semana después los ratones se infectaron con hRSV (cepa A2). **A.** Los sueros se utilizaron en ensayos de microneutralización con los virus indicados en la parte inferior de la gráfica. **B.** Cinco días después de la infección intranasal, los ratones fueron sacrificados y se cuantificó el virus presente en extractos pulmonares mediante ensayos de plaqueo.

La reducción del hRSV en los pulmones de los ratones se correlacionó claramente con los títulos de anticuerpos neutralizantes frente al hRSV. Así, se observaron títulos elevados de este virus en los pulmones de los ratones inoculados solo con CpG o con la proteína F post-fusión del hMPV, mientras que no se detectó virus en los pulmones de los ratones inmunizados con la proteína F post-fusión del hRSV.

En dos de los ratones inmunizados con la quimera F-415 (#6 y #7) no se detectó virus en los pulmones. Estos dos ratones también fueron los que tuvieron los títulos más elevados de anticuerpos neutralizantes en sus sueros (comparar figuras 35 A y B). Como grupo, los ratones inmunizados con la quimera F-415 tuvieron una reducción sustancial de los títulos de virus hRSV en los pulmones, en comparación con los grupos control de CpG y aquellos inmunizados con la F post-fusión de hMPV. Sin embargo, el resultado más notable fue la total ausencia de hRSV en los pulmones de todos los ratones inmunizados con la proteína F-416, demostrando con ello la eficacia de la inmunización con esta proteína quimera para la protección frente a una infección por hRSV.

5.2. Proteínas quiméricas F pre-fusión del hRSV con el sitio antigénico IV del hMPV

5.2.1. Expresión y caracterización de proteínas quiméricas F pre-fusión del hRSV con el sitio antigénico IV del hMPV

Recientemente se ha demostrado que la mayoría de los anticuerpos neutralizantes presentes en sueros humanos se unen a la forma pre-fusión de la proteína F del hRSV (Magro *et al.*, 2012), y que los anticuerpos con mayor capacidad neutralizante van dirigidos frente al sitio antigénico Ø, que es exclusivo de la forma pre-fusión de la proteína F del hRSV (McLellan, 2015; McLellan *et al.*, 2013b). Por lo tanto, una proteína F quimérica basada en la forma pre-fusión de la proteína F del hRSV podría tener unas características inmunogénicas mejoradas. Además, contribuiría a demostrar que la metodología de las proteínas F quiméricas puede extenderse no solo a las descritas en el apartado anterior, sino también a otras quimeras basadas en distintas conformaciones y sitios antígenicos.

Por ello, se generaron plásmidos pRB21 que codificaban proteínas quiméricas basadas en la forma pre-fusión de la proteína F del hRSV, donde residuos de los sitios antígenicos II y IV del hRSV se intercambiaron por sus homólogos del hMPV (Figura 29). El nivel de expresión de las quimeras F pre-fusión del hRSV con residuos del sitio antigénico II del hMPV fue muy bajo y se decidió no continuar analizándolas (ver Figura 29). Por tanto, en este apartado de la tesis se describen las proteínas F quiméricas F-410, F-411 y F-412, derivadas de una forma soluble de la proteína F del hRSV, estabilizada en su conformación pre-fusión (McLellan *et al.*, 2013a), en la que se intercambió un número creciente

de residuos del sitio antigénico IV del hRSV por los equivalentes del hMPV. Los plásmidos que codificaban para las proteínas F quiméricas F-410, F-411 y F-412 se incorporaron a virus vaccinia recombinantes para su posterior estudio.

Para generar la proteína F quimérica F-410, cinco aminoácidos del sitio antigénico IV del hRSV se intercambiaron por los residuos correspondientes del hMPV (Figura 36). En la quimera F-411 se cambiaron seis aminoácidos adicionales para que el sitio antigénico IV fuese más parecido al del hMPV. Por último se generó la proteína F-412, con cinco cambios adicionales a los que llevaba la F-411, pero la proteína F quimérica F-412, pese a tener niveles de expresión moderados, no se unió a AcMs específicos del sitio IV del hMPV, por lo que no se continuó su estudio.

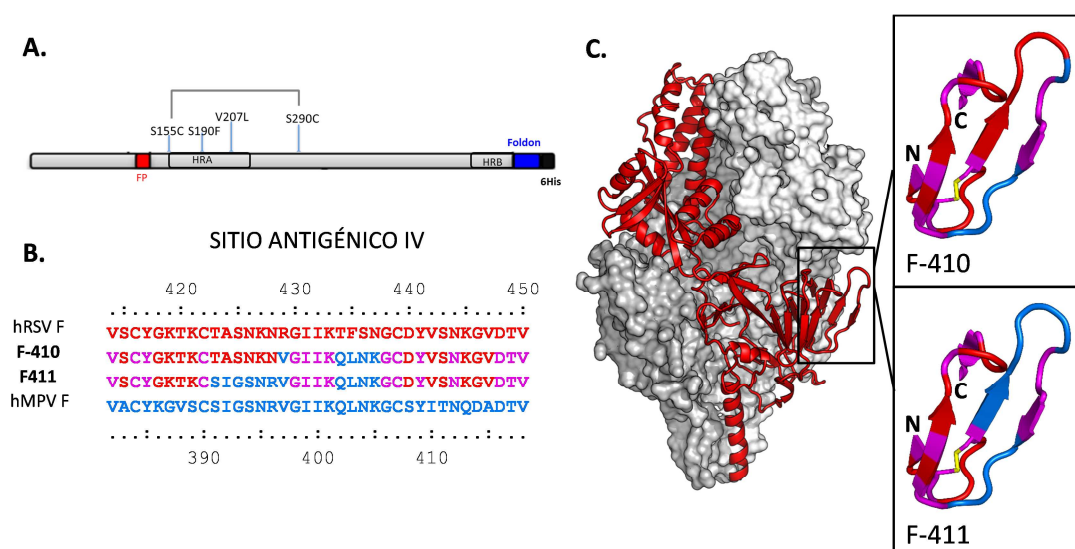


Figura 36. Diseño de las quimeras basadas en la proteína F pre-fusión del hRSV con cambios de aminoácidos del sitio antigénico IV del hMPV. **A.** Esquema del ectodominio de la proteína pre-fusión hRSV F DsCav1 (McLellan *et al.*, 2013a). En esta proteína se había introducido un puente disulfuro adicional intracatenario cambiando los residuos S155 y S290 por Cys. También se habían añadido las mutaciones S190F y V207L para rellenar cavidades de la superficie de la proteína. En azul se muestra el dominio de oligomerización "Foldon" y en negro la cola de histidinas para su purificación. **B.** Secuencia parcial de aminoácidos del sitio antigénico IV de hRSV (rojo) y hMPV (azul). El color de los residuos de las secuencias de F-410 y F-411 indica el origen de estos residuos del sitio antigénico IV en las secuencias "wild-type". Los aminoácidos compartidos entre las secuencias del hRSV y del hMPV están coloreados en rosa. **C.** Representación de superficie de la proteína F del hRSV en su conformación pre-fusión (McLellan, 2013). Se representa la estructura secundaria de uno de sus protómeros. El sitio antigénico IV está ampliado y coloreado como se explica en la parte A para las quimeras F-410 y F-411.

Las proteínas F-410 y F-411 se purificaron por cromatografía de afinidad a iones de Ni^{2+} seguida de una cromatografía de filtración en gel. Ambas proteínas

quiméricas eluían de la columna como un pico homogéneo aproximadamente en la misma posición que la proteína F pre-fusión del hRSV de la que procedían (Figura 37.A). Las dos quimeras mostraron un nivel de pureza cercano al 95% en SDS-PAGE y estaban totalmente procesadas en sus cadenas F₁ y F₂ (Figura 37.B). Por último, mediante microscopía electrónica, se observó que ambas tenían la forma globular característica de la conformación pre-fusión de la proteína F del hRSV (Figura 37.C).

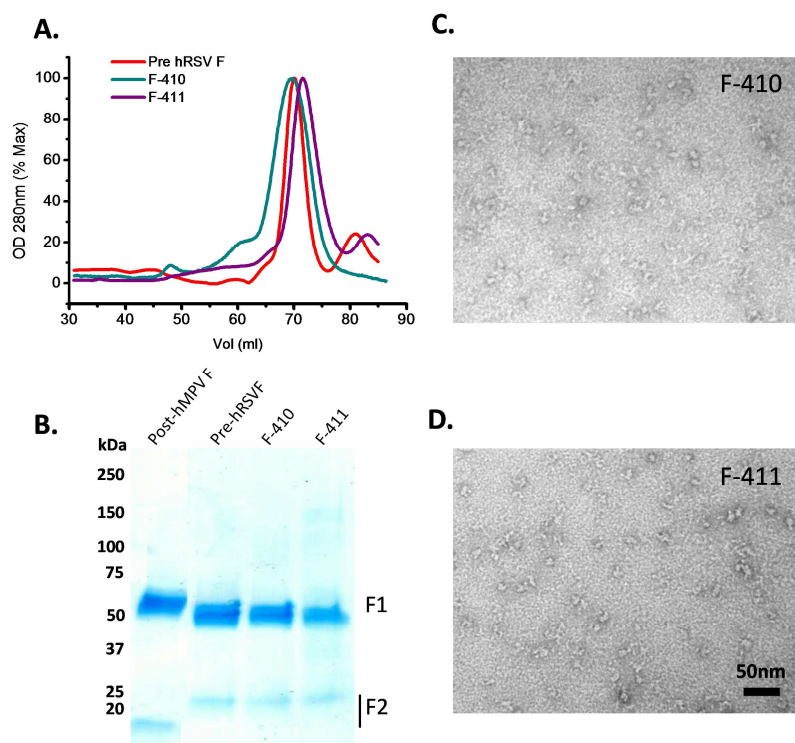


Figura 37. Purificación del ectodominio de las proteínas F quiméricas F-410 y F-411 solubles. **A.** Cromatograma de la filtración en gel. Los perfiles de cada una de las proteínas están normalizados respecto del 100% de la OD₂₈₀ máxima. **B.** SDS-PAGE (gradiente discontinuo de 4-12% de acrilamida) en condiciones desnaturizantes y reductoras, teñido con BlueSave. Los números de la izquierda corresponden a la masa molecular (kDa, kilodalton). Las subunidades F1 y F2 se indican a la derecha. **C. y D.** Imágenes de ME obtenidas por tinción negativa de las quimeras F-410 y F-411 respectivamente.

Las propiedades antigénicas de las quimeras F-410 y F-411 se evaluaron en ELISA con AcMs específicos que reconocen a las proteínas F “wild-type” del hRSV y del hMPV (Figura 38). La proteína F-410 mostró una reducción en la unión al AcM 107F (AcM específico del sitio antigénico IV del hRSV) y adquirió una reactividad parcial con el AcM MF16 (específico del sitio antigénico IV del hMPV). La quimera F-411 mostró una pérdida total de unión al AcM 107F e incrementó su reactividad con el AcM MF16 así como una baja reactividad con el AcM MF20. La

unión del AcM 101F, que posee reactividad cruzada entre las proteínas F del hRSV y del hMPV, se mantuvo tanto con las proteínas F post-fusión “wild-type” como con las dos proteínas F quiméricas.

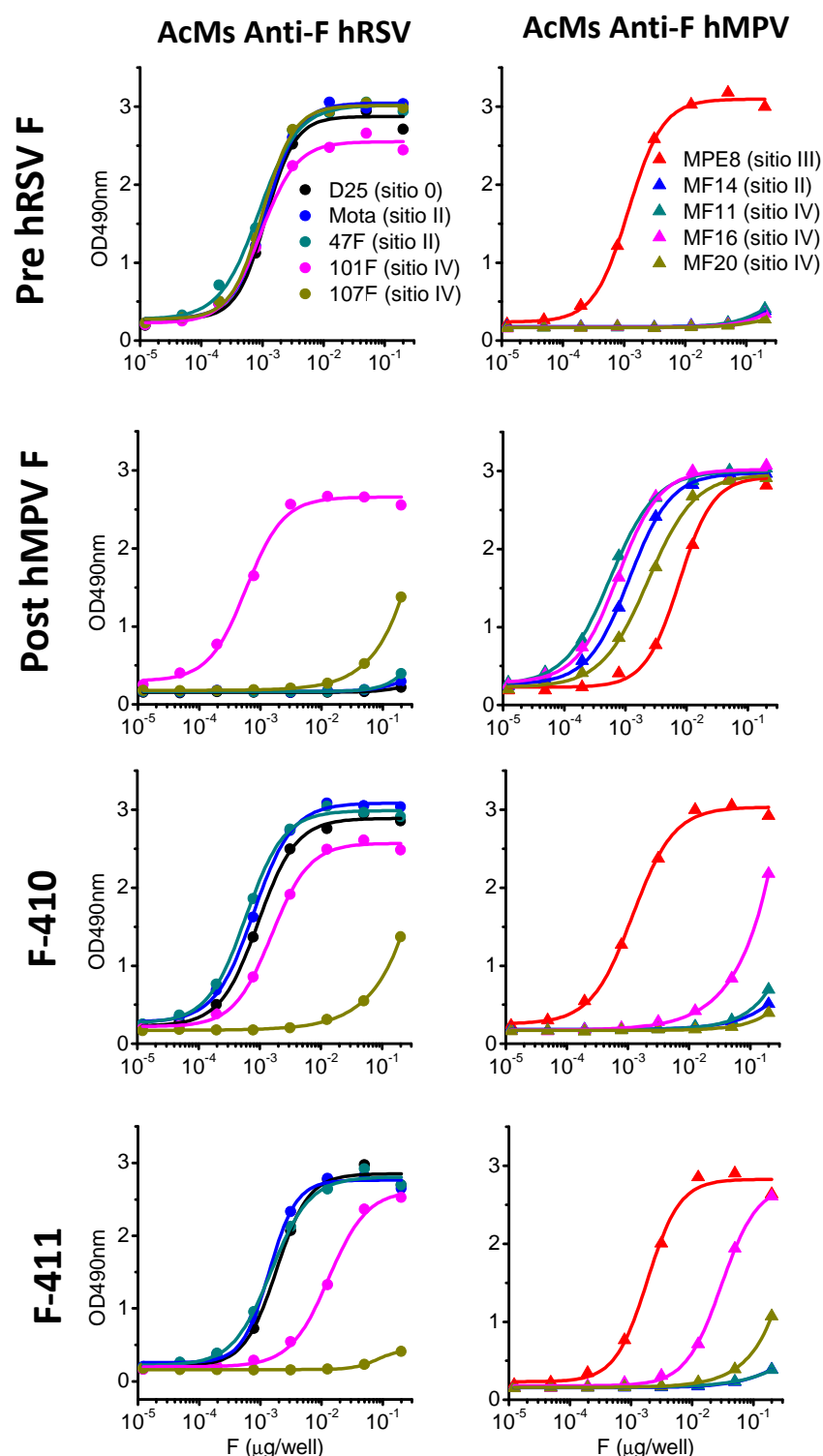


Figura 38. Caracterización antigénica de las proteínas F pre-fusión del hRSV y F post-fusión del hMPV “wild-type” y de las quimeras F-410 y F-411 con AcMs específicos del hRSV y del hMPV. Reactividad en ELISA de captura de los AcMs específicos de hRSV (izquierda) y hMPV (derecha) con las proteínas indicadas a la izquierda de la figura. La localización de los sitios antigénicos donde se unen cada uno de los AcMs se encuentra entre paréntesis en las dos gráficas superiores.

Para demostrar con mayor detalle que las proteínas quiméricas F-410 y F-411 mantenían las características antigénicas de la conformación pre-fusión de la proteína F de hRSV de la que partían, se evaluó su unión a AcMs específicos de conformación específicos de la proteína F del hRSV (Figura 39). Las proteínas F quiméricas F-410 y F-411 se unieron a tres AcMs (D25, AM22 y 5C4) del sitio antigénico Ø, específico de la conformación pre-fusión, así como a dos AcMs (14402 y 11569) del sitio antigénico V, igualmente específico de la forma pre-fusión de la proteína F del hRSV. En cambio, las proteínas F-410 y F-411 no se unieron a tres AcMs (114F, 116F y 117F) que reconocen el motivo estructural 6-HB, característico de la conformación post-fusión de la proteína F del hRSV.

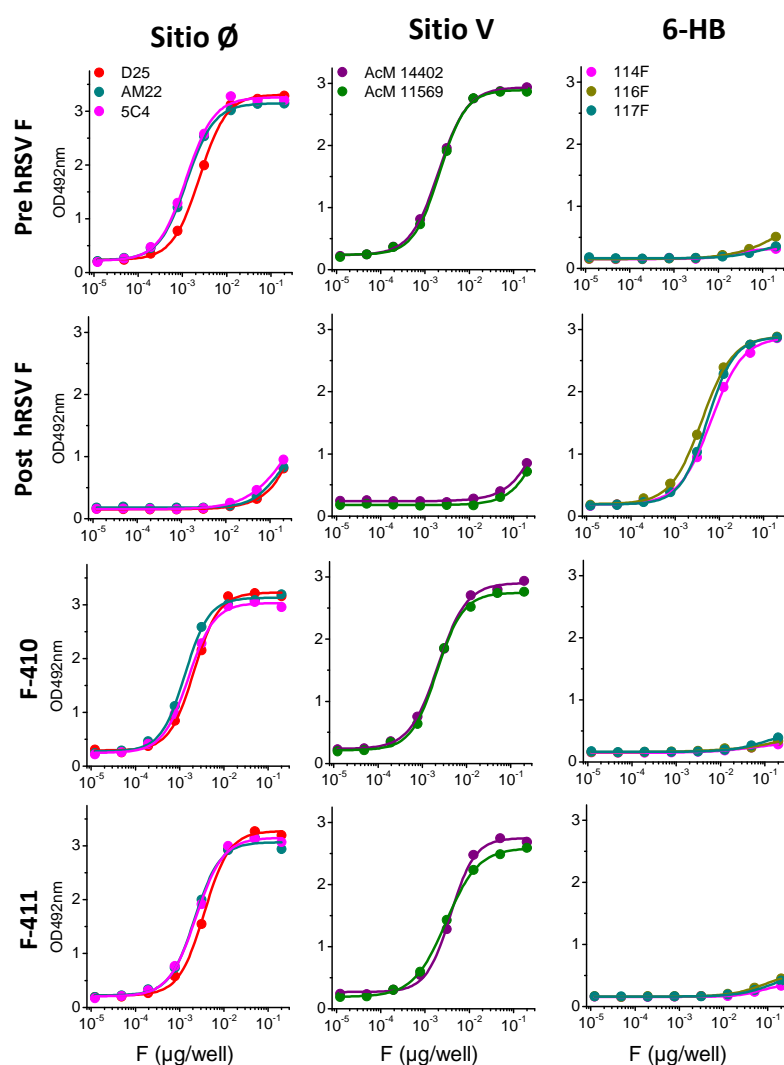


Figura 39. Ampliación de la caracterización antigénica de las quimeras F-410 y F-411. ELISA de captura de las proteínas indicadas a la izquierda con los Acms indicados en los paneles superiores, como se describió en el apartado 7.1.3 de Materiales y Métodos. Los AcMs D25, AM22 y 5C4 reconocen epítomos del sitio antigénico Ø específico de la conformación pre-fusión de la proteína F del hRSV. Los AcMs 14402 y 11569 reconocen epítomos del sitio antigénico V específico de la conformación pre-fusión de la proteína F del hRSV. Los AcMs 114F, 116F y 117F reconocen epítomos del dominio de 6-HB característico de la conformación post-fusión de la F del hRSV.

5.2.2. Inmunogenicidad de las proteínas F quiméricas F-410 y F-411

Para evaluar sus propiedades inmunogénicas, las proteínas F-410 y F-411, junto a las proteínas control F pre-fusión del hRSV y F post-fusión del hMPV, se utilizaron para inmunizar grupos de 5 ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas (dos dosis de 10 µg por dosis, junto con CpG como adyuvante). Los resultados del ELISA (Figura 40.A) llevado a cabo con los sueros correspondientes mostraron un incremento sustancial de AcMs que reconocían a la F post-fusión del hMPV en los sueros de los ratones inmunizados con F-410 y sobre todo F-411, en comparación con los sueros de ratones inmunizados con la proteína F pre-fusión del hRSV. También se observó un incremento sustancial de la capacidad para neutralizar al hMPV en los sueros de ratones inmunizados con F-410 y, sobre todo, con F-411 (Figura 40.B), comparados con los sueros del grupo control inmunizados con la proteína F pre-fusión del hRSV. Igualmente se confirmó, como ya se había descrito con anterioridad (Mas, 2016), que la inmunización de ratones con las proteínas F pre-fusión del hRSV y F post-fusión del hMPV no inducen neutralización cruzada significativa.

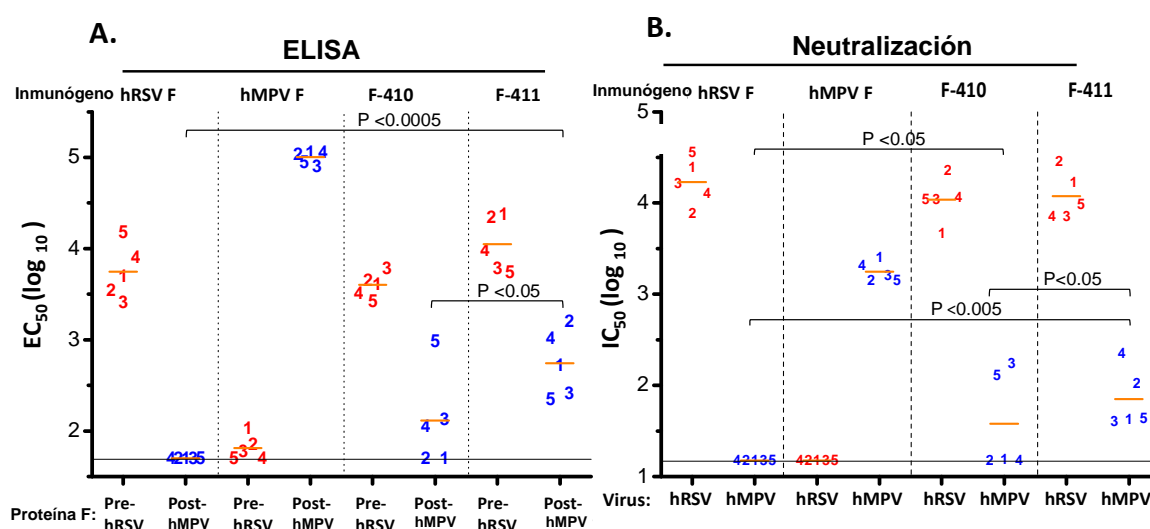


Figura 40. Titulos de ELISA y neutralización de los sueros de ratones inmunizados con las proteínas F pre-fusión del hRSV y F post-fusión del hMPV “wild-type” y quimeras F-410 y F-411. Grupos de cinco ratones hembras fueron inoculados con dos dosis de 10µg de las proteínas indicadas en la parte superior de cada panel. Las proteínas F “wild-type” del hRSV y las quimeras F-410 y F-411 están estabilizadas en la conformación pre-fusión mientras que la proteína F del hMPV está estabilizada en la conformación post-fusión. Una semana después de la última dosis los ratones se sacrificaron y se obtuvo su sangre por punción cardiaca. **A.** ELISA de los sueros de los ratones inmunizados con las proteínas indicadas en la parte superior de cada panel frente a las proteínas indicadas en la parte inferior. **B.** Ensayo de microneutralización de los virus de hRSV y hMPV con los sueros de ratones inmunizados con la proteína indicada en la parte superior de cada panel.

En resumen, los resultados de este apartado demuestran que es posible obtener proteínas F quiméricas basadas en la forma pre-fusión de la proteína F del hRSV incorporando cambios en el sitio antigénico IV que la asimilan a la proteína F del hMPV. Estas proteínas son capaces de inducir en ratones anticuerpos que se unen a la proteínas F del hMPV y que tienen una actividad neutralizante frente al hMPV. Estos resultados expanden aún más las posibles aplicaciones de proteínas F quiméricas para el diseño de vacunas “universales” frente a dos de los pneumovirus más prevalentes en humanos.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. Obtención de AcMs específicos de la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV

En este trabajo se presenta un grupo de AcMs específicos del motivo 6-HB, que está presente exclusivamente en la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV. Para su obtención, se inmunizaron ratones con la proteína F del hMPV en su conformación post-fusión y posteriormente se les administró una dosis de refuerzo con la proteína GST-HRA-L-HRB, para estimular preferencialmente los linfocitos B que produjesen anticuerpos dirigidos frente al motivo 6-HB de la proteína. El método de selección de los hibridomas fue una etapa crítica en la obtención de estos AcMs. Así, se seleccionaron hibridomas que produjesen AcMs que fuesen positivos para la proteína F post-fusión y para la proteína GST-HRA-L-HRB. Además, también se comprobó que los AcMs presentes en los sobrenadantes reconocían exclusivamente a GST-HRA-L-HRB y no a sus péptidos por separado. Esta metodología resultó exitosa para la obtención de los AcMs específicos de la conformación post-fusión de las proteínas F del hMPV descritos en este trabajo. Estrategias similares se han utilizado en nuestro laboratorio para la obtención de AcMs frente al dominio 6-HB de las proteínas F post-fusión del hRSV (Rodríguez et al., 2015) y del PIV3 (en proceso de redacción).

Los AcMs resultantes MF1, MF2 y MF3, fueron capaces de unirse a la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV en ELISA pero no a la proteína pre-fusión (no mostrados). Además los ensayos de “surface plasmon resonance” (SRP) demostraron también una especificidad de unión por la proteína F post-fusión del hMPV, como se muestra en la Figura 15 para el Fab del AcM MF1. Es de resaltar la alta afinidad del Fab de este anticuerpo por la proteína F post-fusión soluble (K_D 7.94 nM) lo que hace que estos anticuerpos puedan ser reactivos muy útiles para estudios de caracterización estructural de la proteína F. Las imágenes de microscopía electrónica demostraron la unión de estos AcM al tallo de la proteína F post-fusión (Figura 16) de acuerdo con la localización del dominio 6-HB en la molécula. Sin embargo, un resultado inesperado fue que los tres AcMs unieron a la proteína F del hMPV en ensayos de Western-blot tanto en condiciones reductoras como no reductoras (Figura 13). En las condiciones de electroforesis, las regiones HRA y HRB deberían estar desestructuradas y por tanto estos AcMs no deberían reconocer a ese dominio. Es posible sin embargo, que aún en esas condiciones la proteína F mantenga cierta estructura secundaria

que permita dicha unión. De hecho, se han obtenido resultados similares con los AcMs específicos de conformación post-fusión del hRSV (datos no publicados). Además, experimentos de termoestabilidad han demostrado que los epítomos que reconocen estos tres AcMs dentro del motivo estructural 6-HB son más resistentes a la desnaturalización por calor que epítomos de otras regiones de la proteína F (Mas *et al.*, 2016).

Aunque se han descrito AcMs específicos de la conformación post-fusión para las proteínas F del PIV5 (Bissonnette *et al.*, 2006), del hRSV (Palomo *et al.*, 2014) y del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) (Umino *et al.*, 1990), su obtención se produjo de manera fortuita. Sin embargo, nuestro trabajo establece una metodología eficaz para la obtención de AcMs específicos de conformación post-fusión que se ha utilizado también eficazmente para la proteína F del hRSV y del PIV3.

Por ello, este método de obtención de anticuerpos podría usarse en otros virus que tengan el motivo 6-HB, que no solo está presente en conformaciones post-fusión de la proteínas F de los *Pneumoviridae*, sino también en las proteínas F de todos los *Paramyxoviridae* (Lamb *et al.*, 2007). Además, también se podría aplicar a virus que tengan proteínas de fusión tipo I que median en la fusión de las membranas viral y celular (Igonet and Rey, 2012), las cuales se encuentran en virus de las familias *Filoviridae*, *Retroviridae*, *Arenaviridae* y *Coronaviridae*. Esos AcMs podrían ser también muy útiles para estudios estructurales de esas proteínas, como lo han sido para estudios de las proteínas F del hMPV (Battles *et al.*, 2017; Mas *et al.*, 2016) y del hRSV (Palomo *et al.*, 2016).

2. Obtención y caracterización de AcMs dirigidos frente a distintos sitios antigénicos de la proteína F del hMPV

Como se ha mencionado en la introducción, los anticuerpos neutralizantes juegan un papel determinante y primordial en la protección frente a la infección por el hMPV (Alvarez *et al.*, 2004; Hamelin *et al.*, 2005; MacPhail *et al.*, 2004; van den Hoogen *et al.*, 2007). Además, la proteína F es el único antígeno viral capaz de inducir anticuerpos neutralizantes y protectores frente al hMPV (Biacchesi *et al.*, 2005; Skiadopoulou *et al.*, 2004b; Tang *et al.*, 2003). Por ello, se procedió a obtener AcMs neutralizantes para la caracterización antigénica detallada de la proteína F del hMPV.

La experiencia adquirida en nuestro laboratorio con el hRSV fue de gran ayuda para decidir qué inmunógeno utilizar para obtener AcMs neutralizantes. En el caso del hRSV la mayoría de los AcMs neutralizantes más potentes se unen a la forma pre-fusión de la proteína F del hRSV (Magro *et al.*, 2012), especialmente al sitio antigénico Ø, presente exclusivamente en esta conformación de la proteína (Gilman *et al.*, 2016a; McLellan *et al.*, 2013b). Ya que en ese momento no se disponía de la forma pre-fusión de la proteína F del hMPV, se decidió inmunizar ratones con la forma monomérica, puesto que en el hRSV esta forma mantiene epítomos presentes en la forma pre-fusión de la proteína (Swanson *et al.*, 2011). Después de la fusión celular, se seleccionaron aquellos hibridomas que produjesen AcMs capaces de neutralizar la infectividad del hMPV, así como otros que generasen AcMs que, aunque no fuesen neutralizantes, reaccionasen con el monómero de la proteína. Bajo estos criterios de selección se obtuvieron todos los AcMs neutralizantes que se han presentado en esta tesis.

En general, como demuestran los valores de EC₅₀ de la Tabla 4, todos los AcMs neutralizantes obtenidos se unen de manera similar a las conformaciones post-fusión de las proteínas F de los dos sublinajes del hMPV (post-fusión hMPV_{A1} F y hMPV_{B1} F) así como a la proteína pre-fusión hMPV_{A1} F. Este resultado es probable que se deba a que, como hemos demostrado recientemente en el laboratorio, en el caso del hMPV la mayoría de los anticuerpos neutralizantes de preparaciones de Igs humanas reconocen tanto a la conformación pre-fusión como post-fusión de la proteína F (Battles *et al.*, 2017). Esto contrasta con lo encontrado para el hRSV, donde la mayor parte de los anticuerpos neutralizantes en humanos son específicos de la conformación pre-fusión de la proteína F. En cualquier caso, estas discrepancias en las especificidades de los anticuerpos neutralizantes frente a los dos virus podrían dar cuenta de la alta frecuencia de AcMs obtenidos frente a la proteína F del hMPV que reconocen las conformaciones pre- y post-fusión de dicha proteína.

Como se muestra en la Figura 12, algunos de los grupos de competición entre AcMs solapaban parcialmente y también había algunas competiciones no recíprocas. Las razones de estos patrones de competición solapantes entre AcMs dirigidos frente a los sitios antigénicos II y IV no se han podido explicar todavía. No obstante, podría deberse, al menos en parte, a que esos dos sitios antigénicos estén cercanos en la conformación post-fusión de la proteína y, debido al tamaño de los AcMs, se produzcan competiciones entre dos AcMs cuyos epítomos no se

encuentren en el mismo sitio antigénico. Una forma de solventar esos solapamientos sería el desarrollo de ensayos de ELISAS de competición utilizando la proteína F pre-fusión como antígeno, ya que esos sitios antigénicos están más alejados en esa conformación. Por otro lado, en vez de cambiar el antígeno se podrían emplear Fabs en vez AcMs, ya que estos al ser más pequeños y monovalentes probablemente redujesen las discrepancias observadas.

Para localizar los sitios antigénicos donde se encuentran los epítomos a los que se unen estos AcMs se aislaron virus resistentes, como ya se había hecho en el laboratorio para el hRSV (Arbiza *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1998). Además se generaron una serie de proteínas post-fusión hMPV_{A1} F con mutaciones simples descritas por Ulbrandt y col. obtenidas en virus resistentes a una batería de AcMs (Ulbrandt *et al.*, 2008; Ulbrandt *et al.*, 2006). La combinación de los resultados obtenidos en ensayos de unión competitiva al antígeno, de unión a proteínas mutantes y el aislamiento de virus resistentes es una aproximación adecuada para obtener información sobre la arquitectura antigénica de la proteína F del hMPV.

Así, en este trabajo se encontraron las mutaciones A225V y A238T en la proteína F de los virus resistentes a los AcMs MF12, MF14 y MF15. Además, se comprobó que los AcMs MF9 y MF15 perdieron cierta reactividad en ELISA con las proteínas F post-fusión que incorporaban las mutaciones simples A238E y K242N. La localización de estos residuos tanto en la estructura primaria de la proteína F del hMPV (ver Figura 11) como en su estructura atómica (Figura 20), demostró que los AcMs MF9, MF12, MF14 y MF15 se unen a epítomos presentes en el sitio antigénico equivalente al sitio antigénico II de la proteína F del hRSV. Posteriormente, se obtuvo una evidencia adicional de la unión de los anticuerpos MF9, MF12, MF14 y MF15 al sitio antigénico II con las proteínas quiméricas F-415 y F-416. Como se muestra en la Figura 32, la quimera F-415 perdió la reactividad con los AcMs MF9, MF12, MF14 y MF15 lo que de nuevo demuestra que estos AcMs se unen epítomos del sitio antigénico II.

Como se muestra en la Figura 17, el AcM MF9 es el único de este grupo que neutraliza mejor la infectividad del hMPV_{B1} que la de hMPV_{A1}. El sitio antigénico II de la proteína F del hMPV (residuos 223-253) de las cuatro cepas prototípicas del hMPV tiene la misma secuencia de aminoácidos, excepto en el residuo 233, donde hay una diferencia entre las secuencias del linaje A (Asp₂₃₃) y B (Tyr₂₃₃) (van den Hoogen *et al.*, 2002). Ese residuo está muy expuesto en la

superficie de la proteína y podría dar cuenta de la diferencia en la capacidad del AcM MF9 para neutralizar a los dos sublinajes.

Estos AcMs neutralizantes dirigidos frente al sitio antigénico II podrían emplearse profilácticamente para prevenir las infecciones producidas por el hMPV. De hecho se han patentado dos AcMs por la empresa MedImmune (AcMs 234 y 338) dirigidos frente al sitio antigénico II de la proteína F del hMPV, cuya potencia en la reducción de la carga viral en “cotton rats” fue similar a la del Palivizumab frente al hRSV (Ulbrandt *et al.*, 2006). Este AcM es el que se utiliza en la actualidad en la terapia profiláctica frente a infecciones por el hRSV (hRSV Impact Study Group., 1998). En ese sentido los AcMs MF12 y MF14, que son los AcMs más neutralizantes dirigidos frente a este sitio antigénico, podrían ser candidatos para uso profiláctico frente a infecciones por el hMPV.

Otro grupo de AcMs que compitieron por la unión al antígeno fueron MF11, MF16 y MF20. Virus resistentes a los AcMs MF16 y MF20 tenían las mutaciones V397A y K401E, respectivamente. Además, en ensayos de ELISA con proteínas con mutaciones en el sitio antigénico IV se vio que la mutación V397F inhibía la unión del AcM MF20 a la proteína post-fusión hMPV_{A1} F, y la mutación K401T afectaba de manera significativa la unión del MF16 y sobre todo del MF20. Por último, aunque no se aislaron virus resistentes al AcM MF11 por su poca capacidad neutralizante, la mutación K386E redujo su unión a la post-fusión hMPV_{A1} F. La localización de los residuos 386, 397 y 401 tanto en la estructura primaria de la proteína F del hMPV (Figura 11) (Ulbrandt *et al.*, 2008) como en su estructura atómica (Figura 25) demostró que estos tres AcMs reconocen epítomos situados en el sitio antigénico IV de la proteína F del hMPV. Además, Los AcMs MF20 y sobre todo MF16 ganaron reactividad frente a las quimeras F-410 y sobre todo F-411 (Figura 38), lo que corrobora que estos AcMs se unen al sitio antigénico IV.

El sitio antigénico IV es un domino de la proteína F del hMPV altamente conservado, pues en toda su secuencia (residuos 381-420) tan solo hay cambios en dos posiciones al comparar cepas prototípicas de los cuatro sublinajes del virus. Así, en la posición 396 hay un Trp en todos los sublinajes salvo en hMPV_{B1}, que tiene una Arg; y en la posición 404 el linaje A tiene Asp y el B tiene Pro. En la estructura de la proteína F, esos dos residuos que varían entre las cepas del hMPV (residuos 396 y 404), se localizan muy cerca del residuo que generó la resistencia

del virus a la neutralización por el AcM MF20. Por eso, es probable que el epítipo al que se une el AcM MF20 incluya alguno de esos dos residuos, lo que explicaría la distinta capacidad de ese AcM para neutralizar las dos cepas (linajes A1 y B1).

Un último grupo de AcMs, MF17, MF18 y MF19, compitieron entre sí por su unión al antígeno. Estos AcMs se unen de manera similar a las proteínas F post-fusión de los dos sublinajes estudiados, así como a la pre-fusión hMPV F_{A1}. Sin embargo solo tienen actividad neutralizante frente a hMPV_{B1}. El sitio antigénico al que se unen y la aparente discrepancia de resultados entre su capacidad de unión a la proteína F del hMPV_{A1} y su capacidad para neutralizar únicamente a hMPV_{B1} todavía no han podido ser estudiados en profundidad.

En conclusión, se han aislado y caracterizado una serie de AcMs neutralizantes dirigidos frente a los sitios antigénicos II y IV de la proteína F del hMPV. Estos AcMs se unen a diversos epítopos presentes tanto en la conformación pre-fusión como post-fusión de la proteína y serán de gran ayuda para la caracterización antigénica de distintas construcciones de la proteína F del hMPV.

3. Comparación de los sitios antigénicos de las proteínas F del hMPV y del hRSV

La disponibilidad de las estructuras atómicas de la proteína F en las conformaciones pre- y post-fusión del hMPV, recientemente resueltas en nuestro laboratorio, ha hecho posible la localización de los epítopos a los que se unen los AcMs neutralizantes en esas estructuras y comparar la arquitectura antigénica de la proteína F del hMPV con la del hRSV, que está más ampliamente estudiada.

En el caso de la proteína F del hRSV, el mapeo de los epítopos a los que se unen ciertos AcMs neutralizantes y la co-cristalización de fragmentos Fab unidos a la proteína o a péptidos lineales han permitido diferenciar 6 sitios

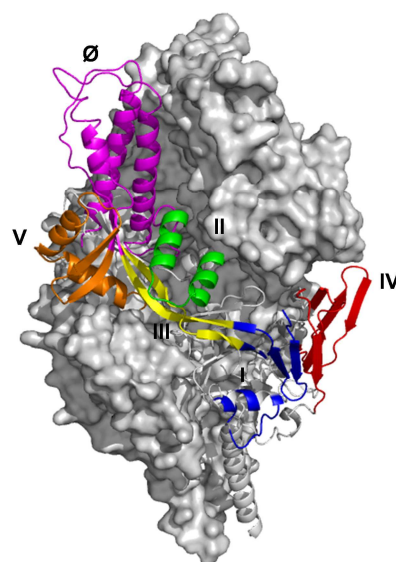


Figura 41. Estructura de la proteína F pre-fusión del hRSV. Se muestra la estructura secundaria de un protómero con los 6 sitios antigénicos coloreados. (Figura modificada de (Gilman *et al.*, 2016a))

antigénicos principales (Figura 41). Así, se ha demostrado que los sitios antigénicos Ø y V son exclusivos de la conformación pre-fusión. Los epítomos que definieron estos sitios antigénicos se delimitaron mediante co-cristalización de la proteína pre-fusión hRSV F unida al Fab del AcMs D25 (McLellan *et al.*, 2013b) y al Fab del AcM RSV90 (Mousa *et al.*, 2017), los cuales se unen a los sitios antigénicos Ø y V respectivamente. Los sitios antigénicos II, III y IV de la proteína F del hRSV están presentes en ambas conformaciones de la proteína y sus epítomos se han delimitado en detalle gracias a la co-cristalización con los Fabs de los AcMs Motavizumab (McLellan *et al.*, 2010b), MPE8 (Corti *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2017) y 101F (McLellan *et al.*, 2010a). El sitio antigénico I solo se ha podido ubicar en la estructura de la proteína F del hRSV por las mutaciones que confieren resistencia al AcM 2F (Magro *et al.*, 2010).

La estructura antigénica de la proteína F del hMPV está menos estudiada que la del hRSV. El aislamiento de virus resistentes frente a AcMs neutralizantes dirigidos a la proteína F del hMPV ha aportado información relevante sobre las similitudes y diferencias antigénicas entre esta proteína y la del hRSV. Así, Ulbrandt y col. (Ulbrandt *et al.*, 2008; Ulbrandt *et al.*, 2006) obtuvieron virus hMPV resistentes a AcMs neutralizantes con cambios de aminoácidos en posiciones equivalentes a los sitios antigénicos Ø, II, III, IV y V de la proteína F del hRSV. Los únicos epítomos de estas dos proteínas que no tienen hasta el momento equivalente en la otra proteína son el sitio antigénico I de la proteína F del hRSV (Arbiza *et al.*, 1992), y el sitio antigénico 7 de la proteína F del hMPV (Wen *et al.*, 2012; Williams *et al.*, 2007), ambos situados en la región globular de la proteína.

La localización de los sitios antigénicos II, IV y 6-HB en la proteína F del hMPV donde se unen los AcMs obtenidos en esta Tesis se muestra en la Figura 42.A en comparación con la localización de los sitios antigénicos en la proteína F del hRSV. En ambas proteínas los sitios antigénicos II y IV están presentes e igualmente accesibles en las conformaciones pre- y post-fusión, lo que concuerda, con la reactividad de los AcMs dirigidos frente a epítomos de esos dos sitios antigénicos.

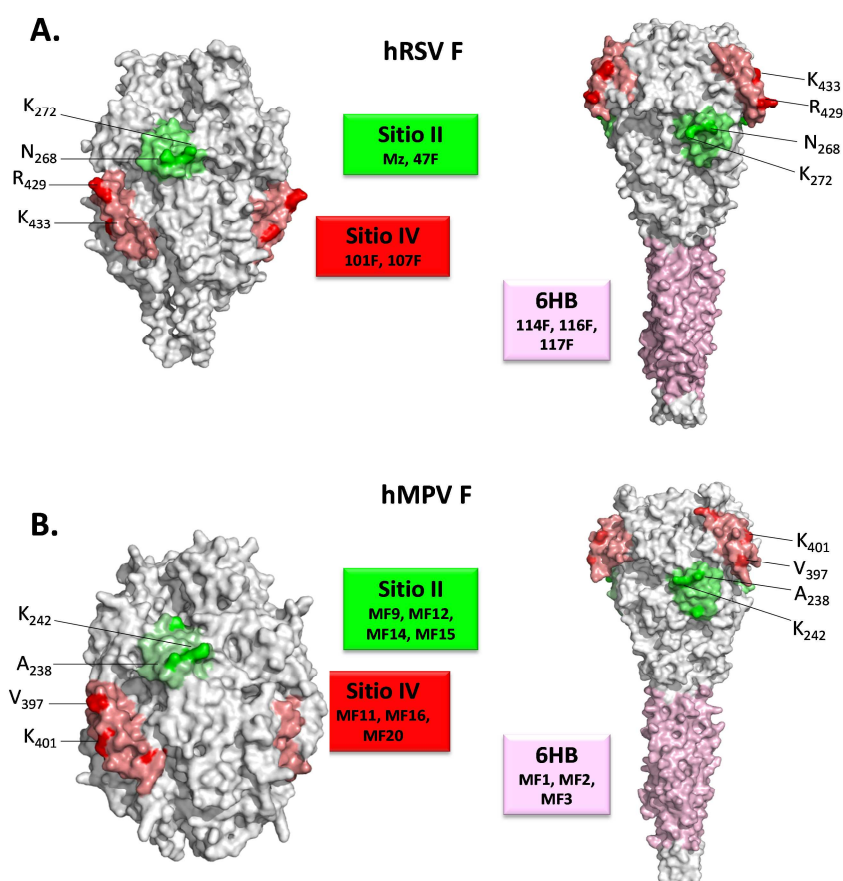


Figura 42. Localización de los sitios antigénicos en las estructuras atómicas de la proteína F pre- y post-fusión del hRSV y del hMPV. **A.** Estructura atómica de la proteína F del hRSV en la conformación pre-fusión (código PDB 4MMV) y post-fusión (código PDB 3RRR), respectivamente. **B.** Estructura atómica de la proteína F del hMPV en la conformación pre-fusión (código PDB pendiente de publicación) y post-fusión (código PDB 5L1X), respectivamente. Los sitios antigénicos II y IV de la proteína F del hRSV están definidos por co-cristalización de los fragmentos Fab de los AcMs Motavizumab y 101F respectivamente. Los sitios antigénicos de la proteína F del hMPV están delimitados por homología con los del hRSV. Se muestran en colores tenues los sitios antigénicos donde se unen los AcMs y en colores más intensos los residuos donde se han aislado virus resistentes o donde se ha perdido reactividad con algún AcM en proteínas mutantes. De los tres sitios antigénicos donde se unen los AcMs obtenidos en esta Tesis, dos son compartidos en ambas conformaciones de la proteína (sitios II y IV en verde y rojo, respectivamente) y solo los AcM que se unen al motivo estructural 6HB son específicos de la conformación post-fusión de las proteínas.

Al comparar la localización de los residuos de las mutaciones obtenidas en los virus resistentes (señalados en colores oscuros en la Figura 42) en los sitios antigénicos II y IV de ambas proteínas, se observa que existen residuos muy relevantes que, al ser mutados, provocan cambios importantes en sus características antigénicas. Así, las posiciones del sitio antigénico II de la proteína F del hMPV Ala₂₃₈ y Lys₂₄₂ y del sitio antigénico IV Val₃₉₇ y Lys₄₀₁, tienen gran relevancia en la unión de los AcMs neutralizantes más potentes dirigidos frente a estos dos sitios antigénicos. En las posiciones equivalentes de la proteína F del hRSV (Asn₂₆₈ y Lys₂₇₂ del sitio antigénico II y Arg₄₂₉ Lys₄₃₃ del sitio IV) también se han localizado cambios en virus resistentes (Arbiza *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2007b;

Zhao *et al.*, 2004). Esta coincidencia entre los “hot-spots” o sitios calientes de generación de resistencia a AcMs neutralizantes en ambos virus probablemente se deba a que los sitios antigénicos II y IV sean importantes para la funcionalidad y la viabilidad de la proteína y si se produjesen mutaciones en otros residuos generarían proteínas no funcionales que harían al virus inviable.

Las similitudes existentes entre las estructuras físicas de las proteínas F del hMPV y del hRSV, y las semejanzas tanto antigénicas como estructurales de sus sitios antigénicos II y IV, sugieren que la estructura antigénica de la proteína F del hMPV debe ser muy similar a la del hRSV. Si fuese así, la forma pre-fusión de la proteína F del hMPV debería inducir una respuesta policlonal de anticuerpos neutralizantes sustancialmente más elevada que la forma post-fusión (Palomo *et al.*, 2016). Así mismo, los anticuerpos neutralizantes más potentes frente al hMPV se unirían al sitio antigénico Ø de su proteína F pre-fusión (Gilman *et al.*, 2016a). Sin embargo, sueros de ratones inmunizados con las dos conformaciones de la proteína F del hMPV tienen títulos de anticuerpos neutralizantes muy similares y los anticuerpos presentes en todos los sueros se unen de manera similar a las dos conformaciones. Esto quiere decir que, probablemente, en el caso del hMPV la mayor parte de los epítomos capaces de inducir anticuerpos neutralizantes están presentes tanto en la conformación pre-fusión como en la post-fusión de su proteína F.

La ausencia de anticuerpos que reaccionan exclusivamente con la proteína F pre-fusión del hMPV en una respuesta policlonal probablemente se debe a que en la proteína F del hMPV hay un sitio de N-glicosilación (Asn₁₇₂) en el sitio antigénico Ø que lo oculta al sistema inmune (Gilman *et al.*, 2016a). Por tanto el sitio equivalente al que se unen los anticuerpos más neutralizantes frente al hMPV está aparentemente bloqueado en la proteína F del hMPV. Esta es una diferencia muy importante desde el punto inmunogénico entre las proteínas F del hRSV y del hMPV. No obstante, se han conseguido aislar esporádicamente AcMs dirigidos frente al sitio antigénico Ø de la proteína F del hMPV en su conformación pre-fusión (Ulbrandt *et al.*, 2008; Ulbrandt *et al.*, 2006) lo que sugiere que los epítomos de ese sitio están muy restringidos en una respuesta policlonal pero no totalmente anulados.

En resumen, se puede concluir que las proteínas F del hMPV y del hRSV son muy similares estructuralmente y que sus sitios antigénicos II y IV están

presentes e igualmente accesibles en las conformaciones pre- y post-fusión de ambas proteínas. Por otro lado, existen diferencias en la relevancia de los sitios antigénicos exclusivos de la conformación pre-fusión (Ø y V) para la inducción de anticuerpos neutralizantes, siendo más relevantes para el hRSV que para el hMPV. Por tanto, y a diferencia de lo que ocurre para el hRSV, una vacuna basada en la proteína F del hMPV estabilizada en su conformación post-fusión tendría la mayor parte de los epítomos relevantes para inducir una respuesta inmune eficaz.

4. Proteínas de fusión quiméricas inducen una respuesta de anticuerpos cross-neutralizante y establecen una vía para el desarrollo de una vacuna universal frente a los pneumovirus

Al menos desde un punto de vista teórico, el concepto de vacunas “universales” (Nabel and Fauci, 2010) ha atraído mucho la atención recientemente. En algunos casos, como el del virus de la gripe (Kanekiyo *et al.*, 2013; Krammer and Palese, 2014; Yassine *et al.*, 2015) o el del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Kwong *et al.*, 2013), se está buscando una vacuna universal que supere la variabilidad de las cepas, de modo que un solo inmunógeno sea capaz de proteger frente a infecciones por virus con propiedades antigénicas altamente divergentes. En otros casos, el objetivo es desarrollar vacunas que protejan frente a infecciones por virus pertenecientes a una misma familia, como es el caso de los virus Zika y dengue de la familia *Flavoviridae* (Barba-Spaeth *et al.*, 2016). También se están diseñando vacunas universales para bacterias como *Neisseria meningitidis*, donde se están probando variantes quiméricos de la proteína del factor de unión H que incorpora epítomos de cepas bacterianas altamente divergentes (Scarselli *et al.*, 2011).

En esta tesis, se han generado una serie de proteínas quiméricas basadas en las proteínas F del hMPV y del hRSV. Estos dos virus son los agentes causales de la mayor parte de las infecciones del tracto respiratorio (ITR) en niños de corta edad. Desde que se demostró que el Palivizumab (Pz), un AcM neutralizante que se utiliza como tratamiento profiláctico en niños, reconoce un epítomo del sitio antigénico II de la proteína F del hRSV, este sitio ha recibido mucha atención en el campo del desarrollo de vacunas frente al hRSV. De hecho, el sitio antigénico II del hRSV se ha insertado en diferentes proteínas para inducir así una respuesta de anticuerpos exclusiva frente a este sitio antigénico tan importante en la inducción de

anticuerpos neutralizantes frente al hRSV (Correia *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015; McLellan *et al.*, 2011a). Pero los resultados obtenidos hasta la fecha habían tenido unos éxitos limitados, ya que los anticuerpos que se indujeron, pese a ser capaces de unirse al sitio antigénico II, no fueron neutralizantes. Tan solo en un caso, donde el sitio antigénico II del hRSV se insertó en una molécula de inmunoglobulina, se consiguió inducir una respuesta de anticuerpos capaz de neutralizar al hRSV *in vitro*, aunque con una eficiencia relativamente baja (Luo *et al.*, 2015). En otro caso, donde se diseñaron computacionalmente estructuras que portaban variaciones del sitio antigénico II, consiguieron que algunas indujesen anticuerpos neutralizantes en algunos de los macacos inmunizados tras repetidas dosis del compuesto, pero esos compuestos no indujeron anticuerpos neutralizantes en ratones (Correia *et al.*, 2014).

Gracias a la reciente obtención de la estructura cristalina de la proteína F del hMPV en la conformación post-fusión se pudo evidenciar la gran similitud estructural que esta tiene con la proteína F del hRSV, especialmente en el sitio antigénico II (Mas *et al.*, 2016). Por ello se pensó que, si se intercambiaban aminoácidos entre las dos proteínas F post-fusión, se podría reproducir el sitio antigénico II de una proteína en la otra sin que el plegamiento ni la integridad estructural del sitio antigénico se viesen modificados sustancialmente en las proteínas quiméricas resultantes. Se obtuvieron así las proteínas quiméricas F-415 y F-416. Estas proteínas F quiméricas se vieron al microscopio electrónico como estructuras cónicas características de la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV. Además, en ensayos de ELISA, las quimeras mostraron propiedades antigénicas del sitio antigénico II de la proteína F del hRSV. De hecho, la afinidad del Fab del AcM Motavizumab (Mz) por la quimera F-416 fue similar a la obtenida con la proteína F post-fusión del hRSV, aunque la afinidad del Fab del Mz por la quimera F-415 fue ~4 veces menor que con la proteína F post-fusión del hRSV. El AcM Mz tiene contacto con 10 residuos del sitio antigénico II del hRSV (S255, L258, I261, N262, D263, N268, D269, K271, S275, y N276), que definen el epítipo al que se une este AcM (McLellan *et al.*, 2010b). En particular, se ha demostrado que los residuos L258, N262 y N268 de la proteína F del hRSV son los que tienen mayor importancia en la interacción con los residuos de los CDRs del Fab de Mz. Como se muestra en la Figura 30.B, la quimera F-416 tiene esos tres residuos cambiados por sus equivalentes del hRSV, mientras que en la quimera F-415 los aminoácidos A228 (L258 en hRSV) y S232 (N262 en hRSV) aún mantienen la

secuencia del hMPV, lo que podría dar cuenta de la diferencia en la afinidad del Fab del Mz por estas dos proteínas quiméricas.

Las quimeras F-415 y sobre todo F-416, fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpos que se unían de forma significativa a la proteína F del hRSV y todos los sueros de los ratones inmunizados con F-416 (y la mayoría de los inmunizados con F-415) neutralizaron la infectividad del hRSV. Además, todos los ratones inmunizados con la quimera F-416 estuvieron totalmente protegidos frente a un desafío con el hRSV. De los ratones inmunizados con F-415, solo dos, que fueron los que tuvieron mayor título de anticuerpos neutralizantes, estuvieron totalmente protegidos. Como se puede ver en la Figura 35, hay ratones individuales inmunizados tanto con F-415 como F-416 que tienen títulos de anticuerpos neutralizantes frente a hRSV equiparables a los obtenidos con sueros de los ratones inmunizados con la proteína F post-fusión del hRSV. También puede observarse que existe una dispersión de los valores de IC_{50} mucho más grande cuando los sueros de ratones inmunizados con las quimeras neutralizan a hRSV que cuando neutralizan a hMPV. No se ha podido esclarecer esta dispersión de los datos obtenidos, pero es probable que, cuando se evalúa la respuesta de anticuerpos inducida frente a un único sitio antigénico se produzcan más diferencias en la respuesta inmune entre los distintos ratones de un mismo grupo que cuando se evalúa la respuesta de anticuerpos generada frente a toda la proteína.

Como otros estudios ya han demostrado ya la capacidad de la proteína F post-fusión del hMPV de inducir una respuesta inmune protectora en “cotton rats” (Cseke *et al.*, 2007), hamsters (Herfst *et al.*, 2007), ratones (Aerts *et al.*, 2015) y macacos (Herfst *et al.*, 2008b), las proteínas quiméricas F-415 y sobre todo F-416 podrían representar una ventaja respecto a aquellas vacunas basadas en insertar sitios antigénicos en otras proteínas cuya única función sea la de mantener su integridad estructural, ya que las proteínas quiméricas podrían conferir protección simultánea frente a dos o más virus.

Mientras se estaban desarrollando las quimeras F-415 y F-416, Wen y col. publicaron una quimera basada en la proteína F del hMPV que incorporaba ciertos aminoácidos del sitio antigénico II del hRSV (RPM-1) (Wen *et al.*, 2016). A diferencia de los resultados mostrados aquí, de los 5 ratones inmunizados con dos dosis de RPM-1 (una dosis de 100 µg/ratón y una dosis de refuerzo con 50 µg) tan solo un ratón generó anticuerpos que se unieron débilmente a la proteína F del

hRSV y en ningún caso neutralizaron a este virus. Nuevas investigaciones son necesarias para determinar si la diferencia entre los resultados obtenidos con las quimeras F-415 y F-416 y los obtenidos con RPM-1 se deben a las diferencias entre los aminoácidos sustituidos o a diferentes protocolos de inmunización. En ese sentido, es de resaltar que las quimeras basadas en la incorporación del sitio antigénico II del hMPV a la proteína del hRSV tanto en su conformación pre-fusión como post-fusión (Figura 29) tuvieron unos muy bajos niveles de expresión. Por tanto, es posible que ciertos cambios de aminoácidos en el sitio antigénico II sean críticos para la expresión y la inmunogenicidad de este tipo de proteínas.

Como la mayoría de los anticuerpos neutralizantes frente al hRSV reconocen epítomos específicos de la forma pre-fusión de la proteína F en humanos (Gilman *et al.*, 2016a; Magro *et al.*, 2012; Ngwuta *et al.*, 2015) se planteó también probar si era posible insertar distintos sitios antigénicos de la proteína F del hMPV en la proteína F pre-fusión del hRSV. Así se generaron las quimeras F-410 y F-411, que son proteínas F pre-fusión del hRSV, con distinto número de aminoácidos del sitio antigénico IV intercambiados por sus homólogos del hMPV. Al observar estas quimeras al microscopio electrónico se vieron moléculas con forma globular característica de la proteína pre-fusión del hRSV. Además, estas quimeras reaccionaron con AcMs específicos de la conformación pre-fusión de la proteína F del hRSV en ensayos de ELISA y ganaron reactividad, al menos parcial, con AcMs específicos del sitio antigénico IV del hMPV. También las dos quimeras indujeron una respuesta policlonal de anticuerpos capaces de unirse a la proteína F del hMPV y neutralizaron la infectividad del hMPV.

Las proteínas F quiméricas descritas en esta tesis requieren futuras optimizaciones, así como la ampliación del número de sitios antigénicos intercambiados. No obstante, los resultados aquí descritos establecen la “prueba de concepto” que demuestra la posibilidad de obtener proteínas quiméricas que contengan epítomos de distintas procedencias, las cuales son capaces de inducir respuestas inmunes cross-neutralizantes y cross-protectoras frente a dos pneumovirus de gran relevancia clínica como son el hRSV y el hMPV (Olmedillas *et al.*, 2017).

En este sentido, ya que el sitio antigénico Ø es muy importante para la inducción de anticuerpos neutralizantes frente al hRSV pero no así para el hMPV, un buen candidato vacunal frente a infecciones por hRSV y hMPV podría ser una

proteína F quimérica basada en la forma pre-fusión del hRSV que tuviese los sitios antigénicos II y IV de la proteína F del hMPV.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La estrategia empleada para la obtención de AcMs específicos de la conformación post-fusión de la proteína F del hMPV, basada en la inmunización de ratones con la proteína F post-fusión del hMPV seguida de una dosis de refuerzo con GST-HRA-L-HRB, permite obtener AcMs que se unen al dominio 6-HB de la proteína F del hMPV. Estos AcMs son muy útiles para caracterizar la conformación de distintas construcciones de la proteína F.
2. Los AcMs dirigidos frente a los sitios antigénicos II y IV de la proteína F del hMPV que se describen en este trabajo reconocen a las conformaciones pre- y post-fusión de la proteína. Esta similitud existente entre los sitios antigénicos de ambas conformaciones concuerda con la semejanza observada de dichas regiones en las estructuras atómicas de las proteínas F pre- y post-fusión del hMPV, recientemente publicadas por nuestro laboratorio.
3. Se han obtenido glicoproteínas F quiméricas basadas en la forma post-fusión de la proteína F del hMPV con el sitio antigénico II intercambiado por su equivalente del hRSV, así como quimeras F pre-fusión del hRSV con el sitio antigénico IV del hMPV.
4. Las proteínas quiméricas ganaron reactividad con AcMs específicos del sitio antigénico del virus heterólogo y perdieron reactividad con AcMs específicos del sitio antigénico que se había cambiado, demostrando el uso potencial de estas quimeras para la identificación de residuos esenciales para unión de AcMs.
5. Las proteínas F quiméricas inducen en ratones BALB/c respuestas policlonales de anticuerpos capaces de neutralizar a ambos virus. Además, dichos ratones quedaron protegidos frente a la infección por el virus heterólogo cuyo sitio antigénico de la proteína F se insertó en la quimera.
6. Estos resultados establecen una metodología novedosa para la obtención de una vacuna “universal” que podría proteger frente a infecciones por todos los *Pneumoviridae* humanos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aerts L, Rheaume C, Carbonneau J, Lavigne S, Couture C, Hamelin ME, and Boivin G (2015) Adjuvant effect of the human metapneumovirus (HMPV) matrix protein in HMPV subunit vaccines. *J Gen Virol*, **96**, 767-774.
2. Afonso CL, Amarasinghe GK, Banyai K, Bao Y, Basler CF, Bavari S, Bejerman N, Blasdel KR, Briand FX, Briese T, Bukreyev A, Calisher CH, Chandran K, Cheng J, Clawson AN, Collins PL, Dietzgen RG, Dolnik O, Domier LL, Durrwald R, Dye JM, Easton AJ, Ebihara H, Farkas SL, Freitas-Astua J, Formenty P, Fouchier RA, Fu Y, Ghedin E, Goodin MM, Hewson R, Horie M, Hyndman TH, Jiang D, Kitajima EW, Kobinger GP, Kondo H, Kurath G, Lamb RA, Lenardon S, Leroy EM, Li CX, Lin XD, Liu L, Longdon B, Marton S, Maisner A, Muhlberger E, Netesov SV, Nowotny N, Patterson JL, Payne SL, Paweska JT, Randall RE, Rima BK, Rota P, Rubbenstroth D, Schwemmle M, Shi M, Smither SJ, Stenglein MD, Stone DM, Takada A, Terregino C, Tesh RB, Tian JH, Tomonaga K, Tordo N, Towner JS, Vasilakis N, Verbeek M, Volchkov VE, Wahl-Jensen V, Walsh JA, Walker PJ, Wang D, Wang LF, Wetzel T, Whitfield AE, Xie JT, Yuen KY, Zhang YZ, and Kuhn JH (2016) Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol*, **161**, 2351-2360.
3. Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, and Holtzman MJ (2006) Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. *J Infect Dis*, **193**, 396-403.
4. Alvarez R, Harrod KS, Shieh WJ, Zaki S, and Tripp RA (2004) Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *J Virol*, **78**, 14003-14011.
5. Arbiza J, Taylor G, Lopez JA, Furze J, Wyld S, Whyte P, Stott EJ, Wertz G, Sullender W, Trudel M, and Melero JA (1992) Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J Gen Virol*, **73 (Pt 9)**, 2225-2234.
6. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, Simon-Loriere E, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Haouz A, England P, Stiasny K, Mongkolsapaya J, Heinz FX, Screaton GR, and Rey FA (2016) Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, **536**, 48-53.
7. Battles MB, Mas V, Olmedillas E, Cano O, Vedovello D, Rodriguez L, Melero JA, and McLellan JS. The prefusion structure of hMPV F glycoprotein unveils unique functional and immunological traits. Olmedillas, E., Cano, O., Vedovello, D., Rodriguez, L., Melero, J. A., and McLellan, J. S. 2017.
8. Beeler JA and Van Wyke CK (1989) Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *J Virol*, **63**, 2941-2950.
9. Bermingham A and Collins PL (1999) The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11259-11264.

10. Biacchesi S, Pham QN, Skiadopoulos MH, Murphy BR, Collins PL, and Buchholz UJ (2005) Infection of nonhuman primates with recombinant human metapneumovirus lacking the SH, G, or M2-2 protein categorizes each as a nonessential accessory protein and identifies vaccine candidates. *J Virol*, **79**, 12608-12613.
11. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, and Buchholz UJ (2003) Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology*, **315**, 1-9.
12. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Yang L, Lamirande EW, Tran KC, Murphy BR, Collins PL, and Buchholz UJ (2004) Recombinant human Metapneumovirus lacking the small hydrophobic SH and/or attachment G glycoprotein: deletion of G yields a promising vaccine candidate. *J Virol*, **78**, 12877-12887.
13. Bissonnette ML, Connolly SA, Young DF, Randall RE, Paterson RG, and Lamb RA (2006) Analysis of the pH requirement for membrane fusion of different isolates of the paramyxovirus parainfluenza virus 5. *J Virol*, **80**, 3071-3077.
14. Blasco R and Moss B (1995) Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene*, **158**, 157-162.
15. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, Peret TC, Erdman DD, and Anderson LJ (2002) Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis*, **186**, 1330-1334.
16. Buchholz UJ, Nagashima K, Murphy BR, and Collins PL (2006) Live vaccines for human metapneumovirus designed by reverse genetics. *Expert Rev Vaccines*, **5**, 695-706.
17. Calder LJ, Gonzalez-Reyes L, Garcia-Barreno B, Wharton SA, Skehel JJ, Wiley DC, and Melero JA (2000) Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. *Virology*, **271**, 122-131.
18. Cane PA, van den Hoogen BG, Chakrabarti S, Fegan CD, and Osterhaus AD (2003) Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. *Bone Marrow Transplant*, **31**, 309-310.
19. Chang A, Masante C, Buchholz UJ, and Dutch RE (2012) Human metapneumovirus (HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate. *J Virol*, **86**, 3230-3243.
20. Collins PL and Karron RA (2013). Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In D.M.Knipe and P.M.Howley. (Ed.), *Fields Virology*, . Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1086-1123.
21. Collins PL, Fearn R, and Graham BS (2013) Respiratory syncytial virus: virology, reverse genetics, and pathogenesis of disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, **372**, 3-38.
22. Collins PL and Graham BS (2008) Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol*, **82**, 2040-2055.

23. Correia BE, Bates JT, Loomis RJ, Baneyx G, Carrico C, Jardine JG, Rupert P, Correnti C, Kalyuzhniy O, Vittal V, Connell MJ, Stevens E, Schroeter A, Chen M, Macpherson S, Serra AM, Adachi Y, Holmes MA, Li Y, Klevit RE, Graham BS, Wyatt RT, Baker D, Strong RK, Crowe JE, Jr., Johnson PR, and Schief WR (2014) Proof of principle for epitope-focused vaccine design. *Nature*, **507**, 201-206.
24. Corti D, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Perez L, Agatic G, Guarino B, Silacci C, Marcandalli J, Marsland BJ, Piralla A, Percivalle E, Sallusto F, Baldanti F, and Lanzavecchia A (2013) Cross-neutralization of four paramyxoviruses by a human monoclonal antibody. *Nature*, **501**, 439-443.
25. Cox RG, Livesay SB, Johnson M, Ohi MD, and Williams JV (2012) The human metapneumovirus fusion protein mediates entry via an interaction with RGD-binding integrins. *J Virol*, **86**, 12148-12160.
26. Crowe JE, Jr., Firestone CY, and Murphy BR (2001) Passively acquired antibodies suppress humoral but not cell-mediated immunity in mice immunized with live attenuated respiratory syncytial virus vaccines. *J Immunol*, **167**, 3910-3918.
27. Cseke G, Wright DW, Tollefson SJ, Johnson JE, Crowe JE, Jr., and Williams JV (2007) Human metapneumovirus fusion protein vaccines that are immunogenic and protective in cotton rats. *J Virol*, **81**, 698-707.
28. de Swart RL, van den Hoogen BG, Kuiken T, Herfst S, van Amerongen G, Yuksel S, Sprong L, and Osterhaus AD (2007) Immunization of macaques with formalin-inactivated human metapneumovirus induces hypersensitivity to hMPV infection. *Vaccine*, **25**, 8518-8528.
29. Deffrasnes C, Cavanagh MH, Goyette N, Cui K, Ge Q, Seth S, Templin MV, Quay SC, Johnson PH, and Boivin G (2008a) Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA. *Antivir Ther*, **13**, 821-832.
30. Deffrasnes C, Hamelin ME, Prince GA, and Boivin G (2008b) Identification and evaluation of a highly effective fusion inhibitor for human metapneumovirus. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 279-287.
31. Delgado MF, Coviello S, Monsalvo AC, Melendi GA, Hernandez JZ, Batalle JP, Diaz L, Trento A, Chang HY, Mitzner W, Ravetch J, Melero JA, Irusta PM, and Polack FP (2009) Lack of antibody affinity maturation due to poor Toll-like receptor stimulation leads to enhanced respiratory syncytial virus disease. *Nat Med*, **15**, 34-41.
32. Dickens LE, Collins PL, and Wertz GW (1984) Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J Virol*, **52**, 364-369.
33. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Yoshioka M, Ma X, and Kobayashi K (2003) Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol*, **70**, 281-283.
34. Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, and Kikuta H (2005) Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent-antibody test. *J Clin Microbiol*, **43**, 1138-1141.

35. Esper F, Martinello RA, Boucher D, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, and Kahn JS (2004) A 1-year experience with human metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis*, **189**, 1388-1396.
36. Falsey AR (2007) Community-acquired viral pneumonia. *Clin Geriatr Med*, **23**, 535-52, vi.
37. Fearn R and Collins PL (1999) Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *J Virol*, **73**, 5852-5864.
38. Freiherst J and Ogra PL (2001) Mucosal immunity and viral infections. *Ann Med*, **33**, 172-177.
39. Gilman MS, Castellanos CA, Chen M, Ngwuta JO, Goodwin E, Moin SM, Mas V, Melero JA, Wright PF, Graham BS, McLellan JS, and Walker LM (2016a) Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors. *Sci Immunol*, **1**, eaaj1879.
40. Gilman MS, Castellanos CA, Chen M, Ngwuta JO, Goodwin E, Moin SM, Mas V, Melero JA, Wright PF, Graham BS, McLellan JS, and Walker LM (2016b) Rapid profiling of RSV antibody repertoires from the memory B cells of naturally infected adult donors. *Sci Immunol*, **1**.
41. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, and Kasel JA (1986) Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child*, **140**, 543-546.
42. Gonzalez-Reyes L, Ruiz-Arguello MB, Garcia-Barreno B, Calder L, Lopez JA, Albar JP, Skehel JJ, Wiley DC, and Melero JA (2001) Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9859-9864.
43. Graham BS, Henderson GS, Tang YW, Lu X, Neuzil KM, and Colley DG (1993) Priming immunization determines T helper cytokine mRNA expression patterns in lungs of mice challenged with respiratory syncytial virus. *J Immunol*, **151**, 2032-2040.
44. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, and Hart CA (2003) Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis*, **9**, 372-375.
45. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, Griffin MR, Poehling KA, Erdman D, Grijalva CG, Zhu Y, and Szilagyi P (2009) The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*, **360**, 588-598.
46. Hamelin ME, Cote S, Laforge J, Lampron N, Bourbeau J, Weiss K, Gilca R, DeSerres G, and Boivin G (2005) Human metapneumovirus infection in adults with community-acquired pneumonia and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis*, **41**, 498-502.
47. Hamelin ME, Couture C, Sackett MK, and Boivin G (2007) Enhanced lung disease and Th2 response following human metapneumovirus infection in mice immunized with the inactivated virus. *J Gen Virol*, **88**, 3391-3400.

48. Hamelin ME, Prince GA, and Boivin G (2006) Effect of ribavirin and glucocorticoid treatment in a mouse model of human metapneumovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 774-777.
49. Hardy RW, Harmon SB, and Wertz GW (1999) Diverse gene junctions of respiratory syncytial virus modulate the efficiency of transcription termination and respond differently to M2-mediated antitermination. *J Virol*, **73**, 170-176.
50. Heininger U, Kruker AT, Bonhoeffer J, and Schaad UB (2009) Human metapneumovirus infections--biannual epidemics and clinical findings in children in the region of Basel, Switzerland. *Eur J Pediatr*, **168**, 1455-1460.
51. Herfst S, de Graaf M, Schrauwen EJ, Ulbrandt ND, Barnes AS, Senthil K, Osterhaus AD, Fouchier RA, and van den Hoogen BG (2007) Immunization of Syrian golden hamsters with F subunit vaccine of human metapneumovirus induces protection against challenge with homologous or heterologous strains. *J Gen Virol*, **88**, 2702-2709.
52. Herfst S, Mas V, Ver LS, Wierda RJ, Osterhaus AD, Fouchier RA, and Melero JA (2008a) Low-pH-induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *J Virol*, **82**, 8891-8895.
53. Herfst S, Schrauwen EJ, de Graaf M, van Amerongen G, van den Hoogen BG, de Swart RL, Osterhaus AD, and Fouchier RA (2008b) Immunogenicity and efficacy of two candidate human metapneumovirus vaccines in cynomolgus macaques. *Vaccine*, **26**, 4224-4230.
54. Igonet S and Rey FA (2012) SnapShot: Viral and eukaryotic protein fusogens. *Cell*, **151**, 1634.
55. Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, and Murakami T (2006) Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol*, **35**, 394-399.
56. Kanekiyo M, Wei CJ, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JR, Rao SS, Kong WP, Wang L, and Nabel GJ (2013) Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies. *Nature*, **499**, 102-106.
57. Karron RA, Buonagurio DA, Georgiu AF, Whitehead SS, Adamus JE, Clements-Mann ML, Harris DO, Randolph VB, Udem SA, Murphy BR, and Sidhu MS (1997a) Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13961-13966.
58. Karron RA, Wright PF, Crowe JE, Jr., Clements-Mann ML, Thompson J, Makhene M, Casey R, and Murphy BR (1997b) Evaluation of two live, cold-passaged, temperature-sensitive respiratory syncytial virus vaccines in chimpanzees and in human adults, infants, and children. *J Infect Dis*, **176**, 1428-1436.

59. Kaul TN, Welliver RC, Wong DT, Udwadia RA, Riddlesberger K, and Ogra PL (1981) Secretory antibody response to respiratory syncytial virus infection. *Am J Dis Child*, **135**, 1013-1016.
60. Kolli D, Bataki EL, Spetch L, Guerrero-Plata A, Jewell AM, Piedra PA, Milligan GN, Garofalo RP, and Casola A (2008) T lymphocytes contribute to antiviral immunity and pathogenesis in experimental human metapneumovirus infection. *J Virol*, **82**, 8560-8569.
61. Krammer F and Palese P (2014) Universal influenza virus vaccines: need for clinical trials. *Nat Immunol*, **15**, 3-5.
62. Krarup A, Truan D, Furmanova-Hollenstein P, Bogaert L, Bouchier P, Bisschop IJ, Widjoatmodjo MN, Zahn R, Schuitemaker H, McLellan JS, and Langedijk JP (2015) A highly stable prefusion RSV F vaccine derived from structural analysis of the fusion mechanism. *Nat Commun*, **6**, 8143.
63. Kuo L, Fearn R, and Collins PL (1996a) The structurally diverse intergenic regions of respiratory syncytial virus do not modulate sequential transcription by a dicistronic minigenome. *J Virol*, **70**, 6143-6150.
64. Kuo L, Grosfeld H, Cristina J, Hill MG, and Collins PL (1996b) Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *J Virol*, **70**, 6892-6901.
65. Kwong PD, Mascola JR, and Nabel GJ (2013) Broadly neutralizing antibodies and the search for an HIV-1 vaccine: the end of the beginning. *Nat Rev Immunol*, **13**, 693-701.
66. Lamb RA (1993) Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology*, **197**, 1-11.
67. Lamb RA and Jardetzky TS (2007) Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. *Curr Opin Struct Biol*, **17**, 427-436.
68. Lambert DM, Barney S, Lambert AL, Guthrie K, Medinas R, Davis DE, Bucy T, Erickson J, Merutka G, and Petteway SR, Jr. (1996) Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2186-2191.
69. Landry ML, Ferguson D, Cohen S, Peret TC, and Erdman DD (2005) Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. *J Clin Microbiol*, **43**, 1950-1952.
70. Lawless-Delmedico MK, Sista P, Sen R, Moore NC, Antczak JB, White JM, Greene RJ, Leanza KC, Matthews TJ, and Lambert DM (2000) Heptad-repeat regions of respiratory syncytial virus F1 protein form a six-membered coiled-coil complex. *Biochemistry*, **39**, 11684-11695.
71. Levy C, Aerts L, Hamelin ME, Granier C, Szecsi J, Lavillette D, Boivin G, and Cosset FL (2013) Virus-like particle vaccine induces cross-protection against human metapneumovirus infections in mice. *Vaccine*, **31**, 2778-2785.

72. Lopez JA, Bustos R, Orvell C, Berois M, Arbiza J, Garcia-Barreno B, and Melero JA (1998) Antigenic structure of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J Virol*, **72**, 6922-6928.
73. Luo X, Liu T, Wang Y, Jia H, Zhang Y, Caballero D, Du J, Wang RE, Wang D, Schultz PG, and Wang F (2015) An Epitope-Specific Respiratory Syncytial Virus Vaccine Based on an Antibody Scaffold. *Angew Chem Int Ed Engl*, **54**, 14531-14534.
74. MacPhail M, Schickli JH, Tang RS, Kaur J, Robinson C, Fouchier RA, Osterhaus AD, Spaete RR, and Haller AA (2004) Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *J Gen Virol*, **85**, 1655-1663.
75. Magro M, Andreu D, Gomez-Puertas P, Melero JA, and Palomo C (2010) Neutralization of human respiratory syncytial virus infectivity by antibodies and low-molecular-weight compounds targeted against the fusion glycoprotein. *J Virol*, **84**, 7970-7982.
76. Magro M, Mas V, Chappell K, Vazquez M, Cano O, Luque D, Terron MC, Melero JA, and Palomo C (2012) Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities for clinical intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 3089-3094.
77. Martino R, Porras RP, Rabella N, Williams JV, Ramila E, Margall N, Labeaga R, Crowe JE, Jr., Coll P, and Sierra J (2005) Prospective study of the incidence, clinical features, and outcome of symptomatic upper and lower respiratory tract infections by respiratory viruses in adult recipients of hematopoietic stem cell transplants for hematologic malignancies. *Biol Blood Marrow Transplant*, **11**, 781-796.
78. Mas V, Herfst S, Osterhaus AD, Fouchier RA, and Melero JA (2011) Residues of the human metapneumovirus fusion (F) protein critical for its strain-related fusion phenotype: implications for the virus replication cycle. *J Virol*, **85**, 12650-12661.
79. Mas V, Rodriguez L, Olmedillas E, Cano O, Palomo C, Terron MC, Luque D, Melero JA, and McLellan JS (2016) Engineering, Structure and Immunogenicity of the Human Metapneumovirus F Protein in the Postfusion Conformation. *PLoS Pathog*, **12**, e1005859.
80. Matthews JM, Young TF, Tucker SP, and Mackay JP (2000) The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J Virol*, **74**, 5911-5920.
81. McLellan JS (2015) Neutralizing epitopes on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *Curr Opin Virol*, **11**, 70-75.
82. McLellan JS, Chen M, Chang JS, Yang Y, Kim A, Graham BS, and Kwong PD (2010a) Structure of a major antigenic site on the respiratory syncytial virus fusion glycoprotein in complex with neutralizing antibody 101F. *J Virol*, **84**, 12236-12244.

83. McLellan JS, Chen M, Joyce MG, Sastry M, Stewart-Jones GB, Yang Y, Zhang B, Chen L, Srivatsan S, Zheng A, Zhou T, Graepel KW, Kumar A, Moin S, Boyington JC, Chuang GY, Soto C, Baxa U, Bakker AQ, Spits H, Beaumont T, Zheng Z, Xia N, Ko SY, Todd JP, Rao S, Graham BS, and Kwong PD (2013a) Structure-based design of a fusion glycoprotein vaccine for respiratory syncytial virus. *Science*, **342**, 592-598.
84. McLellan JS, Chen M, Kim A, Yang Y, Graham BS, and Kwong PD (2010b) Structural basis of respiratory syncytial virus neutralization by motavizumab. *Nat Struct Mol Biol*, **17**, 248-250.
85. McLellan JS, Chen M, Leung S, Graepel KW, Du X, Yang Y, Zhou T, Baxa U, Yasuda E, Beaumont T, Kumar A, Modjarrad K, Zheng Z, Zhao M, Xia N, Kwong PD, and Graham BS (2013b) Structure of RSV fusion glycoprotein trimer bound to a prefusion-specific neutralizing antibody. *Science*, **340**, 1113-1117.
86. McLellan JS, Correia BE, Chen M, Yang Y, Graham BS, Schief WR, and Kwong PD (2011a) Design and Characterization of Epitope-Scaffold Immunogens That Present the Motavizumab Epitope from Respiratory Syncytial Virus. *J Mol Biol*, **409**, 853-866.
87. McLellan JS, Ray WC, and Peeples ME (2013c) Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, **372**, 83-104.
88. McLellan JS, Yang Y, Graham BS, and Kwong PD (2011b) Structure of the Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein in the Post-fusion Conformation Reveals Preservation of Neutralizing Epitopes. *J Virol*, **85**, 7788-7796.
89. Mejias A and Ramilo O (2008) Review of palivizumab in the prophylaxis of respiratory syncytial virus (RSV) in high-risk infants. *Biologics*, **2**, 433-439.
90. Mink MA, Stec DS, and Collins PL (1991) Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology*, **185**, 615-624.
91. Mok H, Tollefson SJ, Podsiad AB, Shepherd BE, Polosukhin VV, Johnston RE, Williams JV, and Crowe JE, Jr. (2008) An alphavirus replicon-based human metapneumovirus vaccine is immunogenic and protective in mice and cotton rats. *J Virol*, **82**, 11410-11418.
92. Mousa JJ, Kose N, Matta P, Gilchuk P, and Crowe JE, Jr. (2017) A novel pre-fusion conformation-specific neutralizing epitope on the respiratory syncytial virus fusion protein. *Nat Microbiol*, **2**, 16271.
93. Murphy BR and Walsh EE (1988) Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. *J Clin Microbiol*, **26**, 1595-1597.
94. Nabel GJ and Fauci AS (2010) Induction of unnatural immunity: prospects for a broadly protective universal influenza vaccine. *Nat Med*, **16**, 1389-1391.

95. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasasmita C, Simoes EA, Rudan I, Weber MW, and Campbell H (2010) Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, **375**, 1545-1555.
96. Ngwuta JO, Chen M, Modjarrad K, Joyce MG, Kanekiyo M, Kumar A, Yassine HM, Moin SM, Killikelly AM, Chuang GY, Druz A, Georgiev IS, Rundlet EJ, Sastry M, Stewart-Jones GB, Yang Y, Zhang B, Nason MC, Capella C, Peeples ME, Ledgerwood JE, McLellan JS, Kwong PD, and Graham BS (2015) Prefusion F-specific antibodies determine the magnitude of RSV neutralizing activity in human sera. *Sci Transl Med*, **7**, 309ra162.
97. Niizuma T, Okumura A, Kinoshita K, and Shimizu T (2014) Acute encephalopathy associated with human metapneumovirus infection. *Jpn J Infect Dis*, **67**, 213-215.
98. Olmedillas E, Cano O, Martinez I, Luque D, Terron MC, McLellan JS, Melero JA, and Mas V. (2017) Chimeric fusion proteins set the stage for human pan-Pneumoviridae vaccines. *EMBO mol. med* (in press).
99. Palomo C, Mas V, Thom M, Vazquez M, Cano O, Terron MC, Luque D, Taylor G, and Melero JA (2016) Influence of Respiratory Syncytial Virus F Glycoprotein Conformation on Induction of Protective Immune Responses. *J Virol*, **90**, 5485-5498.
100. Palomo C, Mas V, Vazquez M, Cano O, Luque D, Terron MC, Calder LJ, and Melero JA (2014) Polyclonal and monoclonal antibodies specific for the six-helix bundle of the human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein as probes of the protein post-fusion conformation. *Virology*, **460-461C**, 119-127.
101. Papenburg J, Carbonneau J, Isabel S, Bergeron MG, Williams JV, De SG, Hamelin ME, and Boivin G (2013) Genetic diversity and molecular evolution of the major human metapneumovirus surface glycoproteins over a decade. *J Clin Virol*, **58**, 541-547.
102. Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, Erdman DD, and Anderson LJ (2002) Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis*, **185**, 1660-1663.
103. Pilger DA, Cantarelli VV, Amantea SL, and Leistner-Segal S (2011) Detection of human bocavirus and human metapneumovirus by real-time PCR from patients with respiratory symptoms in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **106**, 56-60.
104. Pribul PK, Harker J, Wang B, Wang H, Tregoning JS, Schwarze J, and Openshaw PJ (2008) Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development. *J Virol*, **82**, 4441-4448.
105. Rodriguez L, Olmedillas E, Mas V, Vazquez M, Cano O, Terron MC, Luque D, Palomo C, and Melero JA (2015) Generation of monoclonal antibodies specific of the postfusion conformation of the *Pneumovirinae* Fusion (F) protein. *J Virol Methods*, 1-8.

106. Russell R, Paterson RG, and Lamb RA (1994) Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology*, **199**, 160-168.
107. Ryder AB, Tollefson SJ, Podsiad AB, Johnson JE, and Williams JV (2010) Soluble recombinant human metapneumovirus G protein is immunogenic but not protective. *Vaccine*, **28**, 4145-4152.
108. Scarselli M, Arico B, Brunelli B, Savino S, Di MF, Palumbo E, Veggi D, Ciocchi L, Cartocci E, Bottomley MJ, Malito E, Lo SP, Comanducci M, Giuliani MM, Cantini F, Dragonetti S, Colaprico A, Doro F, Giannetti P, Pallaoro M, Brogioni B, Tontini M, Hilleringmann M, Nardi-Dei V, Banci L, Pizza M, and Rappuoli R (2011) Rational design of a meningococcal antigen inducing broad protective immunity. *Sci Transl Med*, **3**, 91ra62.
109. Schowalter RM, Smith SE, and Dutch RE (2006) Characterization of human metapneumovirus F protein-promoted membrane fusion: critical roles for proteolytic processing and low pH. *J Virol*, **80**, 10931-10941.
110. Schuster JE, Cox RG, Hastings AK, Boyd KL, Wadia J, Chen Z, Burton DR, Williamson RA, and Williams JV (2014) A Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibody Exhibits In Vivo Efficacy Against Both Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus. *J Infect Dis*.
111. Shinoff JJ, O'Brien KL, Thumar B, Shaw JB, Reid R, Hua W, Santosham M, and Karron RA (2008) Young infants can develop protective levels of neutralizing antibody after infection with respiratory syncytial virus. *J Infect Dis*, **198**, 1007-1015.
112. Shirogane Y, Takeda M, Iwasaki M, Ishiguro N, Takeuchi H, Nakatsu Y, Tahara M, Kikuta H, and Yanagi Y (2008) Efficient multiplication of human metapneumovirus in Vero cells expressing the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J Virol*, **82**, 8942-8946.
113. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Amaro-Carambot E, Surman SR, Collins PL, and Murphy BR (2006) Individual contributions of the human metapneumovirus F, G, and SH surface glycoproteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *Virology*, **345**, 492-501.
114. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E, McAuliffe JM, Elkins WR, St Claire M, Collins PL, and Murphy BR (2004a) The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol*, **78**, 6927-6937.
115. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E, McAuliffe JM, Elkins WR, St CM, Collins PL, and Murphy BR (2004b) The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol*, **78**, 6927-6937.
116. Soota K and Maliakkal B (2014) Ribavirin induced hemolysis: a novel mechanism of action against chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, **20**, 16184-16190.

117. Spetch L, Bowlin TL, and Casola A (2008a) Effect of NMSO3 treatment in a murine model of human metapneumovirus infection. *J Gen Virol*, **89**, 2709-2712.
118. Spetch L, Bowlin TL, and Casola A (2008b) Effect of NMSO3 treatment in a murine model of human metapneumovirus infection. *J Gen Virol*, **89**, 2709-2712.
119. Swanson KA, Settembre EC, Shaw CA, Dey AK, Rappuoli R, Mandl CW, Dormitzer PR, and Carfi A (2011) Structural basis for immunization with postfusion respiratory syncytial virus fusion F glycoprotein (RSV F) to elicit high neutralizing antibody titers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 9619-9624.
120. Tang RS, MacPhail M, Schickli JH, Kaur J, Robinson CL, Lawlor HA, Guzzetta JM, Spaete RR, and Haller AA (2004) Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys. *J Virol*, **78**, 11198-11207.
121. Tang RS, Mahmood K, MacPhail M, Guzzetta JM, Haller AA, Liu H, Kaur J, Lawlor HA, Stillman EA, Schickli JH, Fouchier RA, Osterhaus AD, and Spaete RR (2005) A host-range restricted parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the human metapneumovirus (hMPV) fusion protein elicits protective immunity in African green monkeys. *Vaccine*, **23**, 1657-1667.
122. Tang RS, Schickli JH, MacPhail M, Fernandes F, Bicha L, Spaete J, Fouchier RA, Osterhaus AD, Spaete R, and Haller AA (2003) Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human parainfluenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *J Virol*, **77**, 10819-10828.
123. Techaarpornkul S, Barretto N, and Peebles ME (2001) Functional analysis of recombinant respiratory syncytial virus deletion mutants lacking the small hydrophobic and/or attachment glycoprotein gene. *J Virol*, **75**, 6825-6834.
124. Thammawat S, Sadlon TA, Hallsworth PG, and Gordon DL (2008) Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. *J Virol*, **82**, 11767-11774.
125. Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Barnes AS, Wilson S, Kiener PA, Suzich J, and McCarthy MP (2008) Identification of antibody neutralization epitopes on the fusion protein of human metapneumovirus. *J Gen Virol*, **89**, 3113-3118.
126. Ulbrandt ND, Ji H, Patel NK, Riggs JM, Brewah YA, Ready S, Donacki NE, Folliot K, Barnes AS, Senthil K, Wilson S, Chen M, Clarke L, MacPhail M, Li J, Woods RM, Coelingh K, Reed JL, McCarthy MP, Pfarr DS, Osterhaus AD, Fouchier RA, Kiener PA, and Suzich JA (2006) Isolation and characterization of monoclonal antibodies which neutralize human metapneumovirus in vitro and in vivo. *J Virol*, **80**, 7799-7806.
127. Umino Y, Kohama T, Sato TA, Sugiura A, Klenk HD, and Rott R (1990) Monoclonal antibodies to three structural proteins of Newcastle disease virus: biological characterization with particular reference to the conformational change of envelope glycoproteins associated with proteolytic cleavage. *J Gen Virol*, **71** (Pt 5), 1189-1197.

128. van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, and Fouchier RA (2002) Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*, **295**, 119-132.
129. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, and Osterhaus AD (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*, **7**, 719-724.
130. van den Hoogen BG, Herfst S, de Graaf M, Sprong L, van Lavieren R, van Amerongen G, Yuksel S, Fouchier RA, Osterhaus AD, and de Swart RL (2007) Experimental infection of macaques with human metapneumovirus induces transient protective immunity. *J Gen Virol*, **88**, 1251-1259.
131. van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, de Swart RL, Osterhaus AD, and Fouchier RA (2004) Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis*, **10**, 658-666.
132. Vey M, Schafer W, Berghofer S, Klenk HD, and Garten W (1994) Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol*, **127**, 1829-1842.
133. Walsh EE and Hruska J (1983) Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. *J Virol*, **47**, 171-177.
134. Wen X, Krause JC, Leser GP, Cox RG, Lamb RA, Williams JV, Crowe JE, Jr., and Jardetzky TS (2012) Structure of the human metapneumovirus fusion protein with neutralizing antibody identifies a pneumovirus antigenic site. *Nat Struct Mol Biol*, **19**, 461-463.
135. Wen X, Mousa JJ, Bates JT, Lamb RA, Crowe JE, Jr., and Jardetzky TS (2017) Structural basis for antibody cross-neutralization of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus. *Nat Microbiol*, **2**, 16272.
136. Wen X, Pickens J, Mousa JJ, Leser GP, Lamb RA, Crowe JE, Jr., and Jardetzky TS (2016) A Chimeric Pneumovirus Fusion Protein Carrying Neutralizing Epitopes of Both MPV and RSV. *PLoS One*, **11**, e0155917.
137. Williams JV, Chen Z, Cseke G, Wright DW, Keefer CJ, Tollefson SJ, Hessel A, Podsiad A, Shepherd BE, Sanna PP, Burton DR, Crowe JE, Jr., and Williamson RA (2007) A recombinant human monoclonal antibody to human metapneumovirus fusion protein that neutralizes virus in vitro and is effective therapeutically in vivo. *J Virol*, **81**, 8315-8324.
138. Williams JV, Wang CK, Yang CF, Tollefson SJ, House FS, Heck JM, Chu M, Brown JB, Lintao LD, Quinto JD, Chu D, Spaete RR, Edwards KM, Wright PF, and Crowe JE, Jr. (2006) The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J Infect Dis*, **193**, 387-395.
139. Wright PF, Karron RA, Belshe RB, Shi JR, Randolph VB, Collins PL, O'Shea AF, Gruber WC, and Murphy BR (2007) The absence of enhanced disease with wild type respiratory syncytial virus infection occurring after receipt of live, attenuated, respiratory syncytial virus vaccines. *Vaccine*, **25**, 7372-7378.

140. Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, and Kiener PA (2007a) Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *J Mol Biol*, **368**, 652-665.
141. Wu SJ, Schmidt A, Beil EJ, Day ND, Branigan PJ, Liu C, Gutshall LL, Palomo C, Furze J, Taylor G, Melero JA, Tsui P, Del Vecchio AM, and Kruszynski M (2007b) Characterization of the epitope for anti-human respiratory syncytial virus F protein monoclonal antibody 101F using synthetic peptides and genetic approaches. *J Gen Virol*, **88**, 2719-2723.
142. Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, and Piedra PA (2003) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res*, **60**, 51-59.
143. Wyde PR, Moylett EH, Chetty SN, Jewell A, Bowlin TL, and Piedra PA (2004) Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Res*, **63**, 51-59.
144. Yassine HM, Boyington JC, McTamney PM, Wei CJ, Kanekiyo M, Kong WP, Gallagher JR, Wang L, Zhang Y, Joyce MG, Lingwood D, Moin SM, Andersen H, Okuno Y, Rao SS, Harris AK, Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ, and Graham BS (2015) Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nat Med*, **21**, 1065-1070.
145. Yim KC, Cragin RP, Boukhvalova MS, Blanco JC, Hamlin ME, Boivin G, Porter DD, and Prince GA (2007) Human metapneumovirus: enhanced pulmonary disease in cotton rats immunized with formalin-inactivated virus vaccine and challenged. *Vaccine*, **25**, 5034-5040.
146. Yin HS, Paterson RG, Wen X, Lamb RA, and Jardetzky TS (2005) Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9288-9293.
147. Yin HS, Wen X, Paterson RG, Lamb RA, and Jardetzky TS (2006) Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*, **439**, 38-44.
148. Zhang W, Yang H, Kong X, Mohapatra S, San Juan-Vergara H, Hellermann G, Behera S, Singam R, Lockey RF, and Mohapatra SS (2005) Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med*, **11**, 56-62.
149. Zhao X, Chen FP, and Sullender WM (2004) Respiratory syncytial virus escape mutant derived in vitro resists palivizumab prophylaxis in cotton rats. *Virology*, **318**, 608-612.
150. Zhao X, Singh M, Malashkevich VN, and Kim PS (2000) Structural characterization of the human respiratory syncytial virus fusion protein core. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14172-14177.

VII. PUBLICACIONES

VII. PUBLICACIONES

1. Publicaciones relacionadas con esta Tesis

Rodriguez L, Olmedillas E, Mas V, Vazquez M, Cano O, Terron MC, Luque D, Palomo C, and Melero JA (2015) Generation of monoclonal antibodies specific of the postfusion conformtion of the *Pneumovirinae* Fusion (F) protein. *J Virol Methods*, 1-8.

Olmedillas E, Cano O, Martinez I, Luque D, Terron MC, McLellan JS, Melero JA, and Mas V. (2017) Chimeric fusion proteins set the stage for human pan-Pneumoviridae vaccines EMBO mol. med. (forthcoming).

2. Otras publicaciones

Mas V, Rodriguez L, Olmedillas E, Cano O, Palomo C, Terron MC, Luque D, Melero JA, and McLellan JS (2016) Engineering, Structure and Immunogenicity of the Human Metapneumovirus F Protein in the Postfusion Conformation. *PLoS Pathog*, **12**.

Battles MB, Mas V, Olmedillas E, Cano O, Vedovello D, Rodriguez L, Melero JA, and McLellan JS (2017) Structure and immunogenicity of prefusion-stabilized human metapneumovirus F glycoprotein. *Nat. commun*, (in press).